



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

---

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΟ  
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ»**

**ΑΡΙΣΤΕΙΔΗ Σ. ΒΕΣΚΟΥΚΗ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ**  
**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΟ  
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ»**

**ΑΡΙΣΤΕΙΑ Η Σ. ΒΕΣΚΟΥΚΗ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ  
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

**“Επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες κατά την  
άσκηση”**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ** (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

**ΤΖΙΑΜΟΥΡΤΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρίκαλα.

**ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ**: Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ** (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

**ΤΖΙΑΜΟΥΡΤΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρίκαλα.

**ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ**: Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

**ΒΡΑΜΠΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**: Καθηγητής Εργοφυσιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σέρρες.

**ΜΟΥΓΙΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ**: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

**ΚΥΠΑΡΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ**: Λέκτορας Φυσιολογίας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σέρρες.



ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ Σ. ΒΕΣΚΟΥΚΗΣ

“ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ”

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ Σ. ΒΕΣΚΟΥΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

“ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ”

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 21*

*Συνολικός αριθμός σελίδων: 198*

*Συνολικός αριθμός εικόνων: 63*

*Συνολικός αριθμός πινάκων: 12*

*Συνολικός αριθμός παραρτημάτων: 1*

*Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 359*

## Περίληψη

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχει αυξηθεί ο αριθμός των εργασιών στη βιβλιογραφία, που αναφέρουν ότι η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί ο ρόλος της οξειδάσης της ξανθίνης, του κύριου ενζύμου παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση, στο οξειδωτικό στρες και την αθλητική απόδοση. Ο ρόλος της είναι διττός καθώς οδηγεί τόσο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών όσο και ουρικού οξέος, του σημαντικότερου αντιοξειδωτικού του πλάσματος. Στην εργασία αυτή, η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου πριν από εξαντλητική αερόβια κολύμβηση με χορήγηση ενός συνθετικού αναστολέα της, της αλοπουρινόλης, σε επίμυες προκάλεσε, όπως και η άσκηση, οξειδωτικό στρες και μεγάλη πτώση στην απόδοση. Η πιθανή αναστολή της παραγωγής του ουρικού οξέος, λοιπόν, είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα και την πτώση της απόδοσης, η οποία δε φαίνεται να σχετίζεται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Μια παράλληλη προσέγγιση αφορούσε στην αναστολή του ενζύμου από αναστολείς φυτικής προέλευσης δυνητικά παρόντες στη διατροφή. Ορισμένα εκχύλισμα σταφυλιών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες ανέστειλαν *in vitro* τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και το ισχυρότερο από αυτά χορηγήθηκε σε επίμυες πριν εφαρμοστεί το ίδιο πρωτόκολλο άσκησης για να ελεγχθεί αν η αντιοξειδωτική του δράση ισχύει και *in vivo*. Αυτό δεν επιβεβαιώθηκε καθώς το εκχύλισμα από καρπούς σταφυλιού της ποικιλίας μπατίκι Τυρνάβου προκάλεσε οξειδωτικό στρες στο αίμα και σε διάφορους ιστούς παρόλο που χορηγήθηκε σε μία μέση συγκέντρωση που χρησιμοποιείται σε ανάλογες μελέτες. Η απόδοση, όμως δεν επηρεάστηκε από το εκχύλισμα καθώς η οξειδάση της ξανθίνης δεν ανεστάλη στο βαθμό, που την ανέστειλε η αλοπουρινόλη. Η διατριβή αυτή καθιστά σαφές ότι αν ένα εκχύλισμα έχει αντιοξειδωτική δράση *in vitro* δε σημαίνει ότι αυτό ισχύει και σε ένα *in vivo* σύστημα. Συμπερασματικά, η δράση ενός αντιοξειδωτικού φαίνεται να εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωσή του και το σύστημα, στο οποίο μελετάται ενώ η χορήγηση αντιοξειδωτικών πριν την άσκηση πιθανώς να μην έχει τις αναμενόμενες θετικές επιδράσεις.



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Δημήτρη Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να κάνω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό του καθώς και για την αγαστή συνεργασία που είχαμε καθόλη τη διάρκειά της. Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής για τη συνεισφορά τους στη βελτίωση του κειμένου όπως και για την προθυμία τους να μου προσφέρουν τη βοήθειά τους οποτεδήποτε την επιδίωξα. Πρέπει να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου μας την παρελθούσα τετραετία για το εξαιρετικό κλίμα και τη συνεργασία μας. Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Αντώνη Κυπάρο, το Μιχάλη Νικολαΐδη και τη Χρύσα Σπανού τόσο για τη φιλία τους όσο και για την καθοριστική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Τη μεγαλύτερη ευγνωμοσύνη την οφείλω στην οικογένειά μου λόγω της πολυεπίπεδης στήριξης που μου παρείχε. Για το λόγο αυτό της αφιερώνω την εργασία μου αυτή.

## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε από το 2006 ως το 2010 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Κουρέτα.

### *Γενικά στοιχεία, βασικά ερωτήματα και σκοπός της μελέτης*

Από τις εργασίες των τελευταίων δεκαετιών στο χώρο της βιολογίας της άσκησης έχει επιβεβαιωθεί ότι η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Ένα από τα κυριότερα ένζυμα, που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι η οξειδάση της ξανθίνης. Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο, το ουρικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο ρόλος του, δηλαδή, είναι διττός καθώς μπορεί μεν να προκαλεί οξειδωτικό στρες, λόγω της παραγωγής ελευθέρων ριζών αλλά και να ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών επειδή οδηγεί στην παραγωγή ουρικού οξέος. Έτσι, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να ερευνηθεί αν το ουρικό οξύ ή οι ελεύθερες ρίζες είναι τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη σημασία κατά την άσκηση. Για την επίτευξη του στόχου, η οξειδάση της ξανθίνης ανεστάλη *in vivo* σε επίμυες πριν την άσκηση με χορήγηση τόσο αλοπουρινόλης όσο και ενός φυτικού αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος που *in vitro* αναστέλλει το ένζυμο αυτό.

### *Βασικά ερωτήματα*

Τα βασικά ερωτήματα της έρευνας ήταν τα ακόλουθα:

- Οι επιδράσεις της *in vivo* αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης στην απόδοση και σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα και σε ιστούς επιμύων πριν την άσκηση από ένα συνθετικό αναστολέα της, την αλοπουρινόλη, οφείλονται στην αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών ή του ουρικού οξέος;
- Υπάρχουν δείκτες οξειδωτικού στρες, που όταν μετρηθούν στο αίμα αντανακλούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών και κυρίως του σκελετικού μυός;
- Υπάρχουν *in vitro* φυτικής προέλευσης αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης και άλλων ενζύμων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες;

- Επιβεβαιώνονται οι *in vitro* αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός φυτικής προέλευσης αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση καθώς και στην αναστολή της δραστηρότητας του ενζύμου αυτού μετά από *in vivo* χορήγησή του σε επίμυες πριν την άσκηση;

#### *Σημασία της έρευνας*

Τα αποτελέσματα της έρευνας αναμένεται να βοηθήσουν στην κατανόηση της σημασίας της ενεργοποίησης της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη διάρκεια της άσκησης. Επίσης, μέσω της αναστολής της δραστηρότητάς της τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* αναμένεται να αποτελέσει μία πολύ σημαντική προκαταρκτική μελέτη σχετικά με το είδος και τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών, που πρέπει να χορηγούνται πριν την άσκηση.

#### *Επεξήγηση όρων*

*Ελεύθερες ρίζες* είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (Jenkins, 1988). Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής με αποτέλεσμα να οξειδώνουν άλλα μόρια για να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα.

*Αντιοξειδωτικό* θεωρείται κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge, 2007).

*Οξειδωτικό στρες* είναι η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1991).

*Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση* ονομάζεται η διαδικασία χορήγησης της εξεταζόμενης ουσίας σε υγρή μορφή με σύριγγα στην περιτοναϊκή κοιλότητα (στο κάτω μέρος της κοιλιάς).

- **Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S. Kouretas D (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 33(6): 1140-54.
- **Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Varamenti E. Kouretas D (2008). The effect of allopurinol on protein carbonyls and swimming performance in rats. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics* 22, 360-362.
- **Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D (2009). Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radical Biology & Medicine* 47, 1371–1374.
- **Veskoukis AS**, Kyparos A, Stagos D, Kouretas D (2010). Differential effects of xanthine oxidase inhibition and exercise on albumin concentration in rat tissues. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 35: 244-250.
- Spanou C, **Veskoukis AS**, Stagos D, Liadaki K, Skaltsounis AL, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D (2010). Effects of Grape Extracts on the *in vitro* Activity of Enzymes Involved in Oxidative Stress Regulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (under review).
- **Veskoukis et al.** Effects of xanthine oxidase inhibition and exercise on carbohydrate and fatty acid metabolism (*in preparation*).
- **Veskoukis et al.** A grape extract possesses antioxidant properties *in vitro* but induces oxidative stress after administration in rats before exercise (*in preparation*).

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	viii
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	x
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	1
<b>1. Ελεύθερες ρίζες</b>	2
<b>1.1. Πηγές ελευθέρων ριζών</b>	4
1.1.1. Ενδογενείς πηγές	4
1.1.2. Εξωγενείς πηγές	5
<b>1.2. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών</b>	5
1.2.1. Θετικές επιδράσεις	5
1.2.2. Αρνητικές επιδράσεις	6
<b>1.3. Αντιοξειδωτικά</b>	7
1.3.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	8
1.3.2. Αντιοξειδωτικοί μεταβολίτες	9
1.3.3. Πολυφαινολικές ενώσεις	10
<b>1.4. Οξειδωτικό στρες</b>	17
<b>2. Άσκηση</b>	18
<b>2.1. Ο μεταβολισμός κατά τη διάρκεια της άσκησης</b>	18
2.1.1. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της άσκησης	18
2.1.2. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων κατά τη διάρκεια της άσκησης	20
2.1.3. Διάσπαση του γλυκογόνου κατά την άσκηση	21
2.1.4. Μυϊκό και ηπατικό γλυκογόνο	21
2.1.5. Η επιλογή της πηγής ενέργειας εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης	22
<b>2.2. Πηγές ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση</b>	24
2.2.1. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων	24
2.2.2. Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	24
2.2.3. Η φλεγμονώδης αντίδραση	26
2.2.4. Οι κατεχολαμίνες	26
2.2.5. Τα υπεροξειδιοσώματα	26
2.2.6. Η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης	26
<b>2.3. Άσκηση και οξειδωτικό στρες</b>	27
2.3.1. Η άσκηση συνοδεύεται από εμφάνιση οξειδωτικού στρες	27
2.3.2. Εργασίες όπου η άσκηση δεν προκαλεί οξειδωτικό στρες	29
<b>2.4. Επίδραση της άσκησης στο πρωτεϊνικό προφίλ</b>	29
2.4.1. Εφαρμογές της πρωτεωμικής	30
2.4.2. Μελέτη της πρωτεωμικής έκφρασης κατά την άσκηση	31
<b>2.5. Χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων πριν την άσκηση</b>	31
<b>3. Οξειδοαναγωγή της ξανθίνης</b>	34
<b>4. Αλοπουρινόλη</b>	37
4.1. Ο ρόλος της αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση κατά την άσκηση	40
<b>5. Αλβουμίνη</b>	41
5.1. Ο αντιοξειδωτικός ρόλος της αλβουμίνης	42
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ</b>	45
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	46
<b>1. Πειραματόζωα και πειραματικός σχεδιασμός</b>	48

1.1.	Άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης σε επίμνες	48
1.2.	Άσκηση και χορήγηση φυτικού εκχυλίσματος σε επίμνες	51
1.3.	Εξοικείωση των επιμύων με το νερό	52
1.4.	Πρωτόκολο άσκησης	53
1.5.	Θανάτωση των επιμύων και συλλογή των ιστών	53
2.	<b>Πρωτόκολα δεικτών εκτίμησης του οξειδωτικού στρες</b>	54
2.1.	Χημικά αντιδραστήρια	54
2.2.	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων	54
2.3.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων	54
2.4.	Προσδιορισμός της TAC	54
2.5.	Προσδιορισμός της δραστικότητας της XO	56
2.6.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των TBARS	57
2.7.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της MDA	59
2.8.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	59
2.9.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH	61
2.10.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG	62
2.11.	Προσδιορισμός της δραστικότητας της καταλάσης	64
2.12.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αλβουμίνης	65
3.	<b>Ανίχνευση της μονομερούς και διμερούς αλβουμίνης στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μν μέσω ανάλυσης western</b>	65
4.	<b>Προσδιορισμός της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος του πλάσματος</b>	66
5.	<b>Προετοιμασία των δειγμάτων του υποκνημίδιου μνός και του ήπατος για τον ιστοχημικό προσδιορισμό του γλυκογόνου</b>	67
5.1.	Επεξεργασία των δειγμάτων	67
5.2.	Χρώση periodic acid-Schiff (PAS)	68
5.3.	Ημιποσοτική εκτίμηση του μυϊκού γλυκογόνου με τη χρήση του προγράμματος Image J	69
6.	<b>Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στο πλάσμα</b>	69
7.	<b>Πρωτεωμική ανάλυση</b>	72
7.1.	Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων	72
7.2.	Φασματοσκοπία μάζας	73
8.	<b>Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλίων στη δραστικότητα των ενζύμων XO, CAT και SOD</b>	74
8.1.	Πρωτόκολο προσδιορισμού της δραστικότητας της XO	74
8.2.	Πρωτόκολο προσδιορισμού της δραστικότητας της CAT	74
8.3.	Πρωτόκολο προσδιορισμού της δραστικότητας της SOD	75
9.	<b>Στατιστική ανάλυση</b>	76
	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	78
1.	<b>Επιδράσεις της χορήγησης αλοπουρινόλης πριν την άσκηση</b>	80
1.1.	Η επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης στην απόδοση των επιμύων	80
1.2.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στο αίμα των επιμύων	81
1.3.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στο γαστροκνήμιο μν των επιμύων	87
1.4.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στον καρδιακό μν των επιμύων	92
1.5.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο	97

	οξειδωτικό στρες στο ήπαρ των επιμύων	
1.6.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της MDA και της αλβουμίνης στον ορθό μηριαίο μυ (Rectus Femoris), τον πρόσθιο κνημιαίο μυ (Tibialis Anterior), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Vastus Lateralis), τον εγκέφαλο, τον πνεύμονα και το σπλήνα των επιμύων	101
1.7.	Συσχέτιση συγκεκριμένων δεικτών οξειδωτικού στρες ώστε να ερευνηθεί αν όταν μετρώνται στο αίμα αντανακλούν επαρκώς την οξειδοαναγωγική κατάσταση του σκελετικού μυός, του καρδιακού μυός και του ήπατος	104
1.8.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μονομερούς αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ, τον υποκνημίδιο μυ, τον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ και της διμερούς αλβουμίνης στον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ των επιμύων	107
1.9.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων στο πλάσμα, τον υποκνημίδιο μυ και το ήπαρ των επιμύων	109
1.10.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο πλάσμα των επιμύων	113
1.11.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην πρωτεϊνική έκφραση στον υποκνημίδιο και τον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ των επιμύων	124
2.	<b><i>In vitro</i> επιδράσεις εκχυλισμάτων σταφυλιών σε ένζυμα σχετικά με την παραγωγή ελευθέρων ριζών και την αντιοξειδωτική άμυνα</b>	127
2.1.	Η ανασταλτική δράση εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της XO, της CAT και της SOD	127
3.	<b><i>Επιδράσεις της χορήγησης εκχυλίσματος σταφυλιού σε επίμυες πριν την άσκηση</i></b>	129
3.1.	Η επίδραση της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στην απόδοση των επιμύων	129
3.2.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στο αίμα των επιμύων	129
3.3.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στο γαστροκνήμιο μυ των επιμύων	132
3.4.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στον καρδιακό μυ των επιμύων	134
3.5.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στο ήπαρ των επιμύων	136
3.6.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ των επιμύων	138
3.7.	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα, το γαστροκνήμιο μυ, τον υποκνημίδιο μυ, τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ των επιμύων	140
	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	142
	<b>Συμπεράσματα-προοπτικές</b>	164
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>	165

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	191
1. <i>Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.</i>	191
2. <i>Πρωτόκολο για την πρώτη διάσταση για strip μήκους 18cm και pH 3-10.</i>	192
3. <i>Πρωτόκολο για τη χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.</i>	192
4. <i>Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση western.</i>	193
5. <i>Πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων βόστρυχων, στέμφυλων και καρπών σταφυλιών</i>	194
<b>ABSTRACT</b>	196
<b>ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ</b>	197



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b>	Η GSH (A) και η GSSG (B)	10
<b>Εικόνα 2.</b>	Δομή των φλαβονοειδών. Διακρίνονται οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι A και B και ο πυρανικός δακτύλιος C, με τον οποίο συνδέονται	11
<b>Εικόνα 3.</b>	Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυβενζοϊκών οξέων	12
<b>Εικόνα 4.</b>	Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυκινναμικών οξέων	13
<b>Εικόνα 5.</b>	Η χημική δομή των στιλβενοειδών (A) και της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης (B)	13
<b>Εικόνα 6.</b>	Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες	17
<b>Εικόνα 7.</b>	Ο μηχανισμός δράσης της οξειδαναγωγάσης της ξανθίνης (XOR) στο φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	25
<b>Εικόνα 8.</b>	(A) Πτερίνη, (B) ο συμπαράγοντας μολυβδενίου, ο οποίος αποτελείται από ένα άτομο Mo συνδεδεμένου στην πτερίνη με δύο άτομα S	35
<b>Εικόνα 9.</b>	Οι αντιδράσεις που καταλύουν η XO (A) και η XDH (B)	37
<b>Εικόνα 10.</b>	Η αλοπουρινόλη και η οξυπουρινόλη ως δομικά ανάλογα της υποξανθίνης και της ξανθίνης, αντίστοιχα	38
<b>Εικόνα 11.</b>	Οι αντιδράσεις που αναστέλλει η αλοπουρινόλη	39
<b>Εικόνα 12.</b>	Το μόριο της αλβουμίνης και οι περιοχές που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική της δράση	43
<b>Εικόνα 13.</b>	Πειραματικός σχεδιασμός του πειράματος χορήγησης αλοπουρινόλης	51
<b>Εικόνα 14.</b>	Πειραματικός σχεδιασμός του πειράματος χορήγησης εκχυλίσματος	52
<b>Εικόνα 15.</b>	Η αναγωγή της ρίζας DPPH <sup>•</sup> στο σταθερό μόριο DPPH:H	55
<b>Εικόνα 16.</b>	Η ένωση του TBA με την MDA οδηγεί στο σχηματισμό μίγματος (TBARS)	57
<b>Εικόνα 17.</b>	Ο μηχανισμός οξειδωσης της GSH σε GSSG με ταυτόχρονο σχηματισμό του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος από το DTNB	61
<b>Εικόνα 18.</b>	Η επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης στην απόδοση των επιμύων.	80
<b>Εικόνα 19.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο πλάσμα.	81
<b>Εικόνα 20.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα (A) και τα ερυθροκύτταρα (B).	82
<b>Εικόνα 21.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο πλάσμα (A) και τα ερυθροκύτταρα (B).	83
<b>Εικόνα 22.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα.	84
<b>Εικόνα 23.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην TAC στο πλάσμα.	84
<b>Εικόνα 24.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (A), της GSSG (B) και του λόγου GSH/GSSG στα ερυθροκύτταρα.	86
<b>Εικόνα 25.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο γαστροκνήμιο μυ.	87
<b>Εικόνα 26.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ.	88
<b>Εικόνα 27.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο γαστροκνήμιο μυ.	88
<b>Εικόνα 28.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ.	89
<b>Εικόνα 29.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην TAC στο γαστροκνήμιο μυ.	89

<b>Εικόνα 30.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (Α), της GSSG (Β) και του λόγου GSH/GSSG στο γαστροκνήμιο μυ.	91
<b>Εικόνα 31.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στον καρδιακό μυ.	92
<b>Εικόνα 32.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό μυ.	93
<b>Εικόνα 33.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στον καρδιακό μυ.	93
<b>Εικόνα 34.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στον καρδιακό μυ.	94
<b>Εικόνα 35.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στον καρδιακό μυ.	94
<b>Εικόνα 36.</b>	επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (Α), της GSSG (Β) και του λόγου GSH/GSSG (Γ) στον καρδιακό μυ.	96
<b>Εικόνα 37.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο ήπαρ.	97
<b>Εικόνα 38.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ.	97
<b>Εικόνα 39.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ.	98
<b>Εικόνα 40.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στο ήπαρ.	98
<b>Εικόνα 41.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην TAC στο ήπαρ.	99
<b>Εικόνα 42.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (Α), της GSSG (Β) και του λόγου GSH/GSSG (Γ) στο ήπαρ.	100
<b>Εικόνα 43.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της MDA στον ορθό μηριαίο μυ (Α), τον πρόσθιο κνημιαίο μυ (Β), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Γ), τον εγκέφαλο (Δ), τον πνεύμονα (Ε) και το σπλήνα (ΣΤ) των επιμύων.	102
<b>Εικόνα 44.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορθό μηριαίο μυ (Α), τον πρόσθιο κνημιαίο μυ (Β), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Γ), τον εγκέφαλο (Δ), τον πνεύμονα (Ε) και το σπλήνα (ΣΤ) των επιμύων.	103
<b>Εικόνα 45.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ (Α), τον υποκνημίδιο μυ (Β), τον EDL (Γ), το ήπαρ (Δ) και τον καρδιακό μυ (Ε).	108
<b>Εικόνα 46.</b>	Η ανίχνευση της μονομερούς (Α) και της διμερούς αλβουμίνης (Β) στον EDL των επιμύων μέσω ανάλυσης Western.	109
<b>Εικόνα 47.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα.	110
<b>Εικόνα 48.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff.	111
<b>Εικόνα 49.</b>	Ποσοτικοποίηση της επίδρασης της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο.	111
<b>Εικόνα 50.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-	112

	Schiff. από χρώση Periodic Acid-Schiff.	
<b>Εικόνα 51.</b>	Ποσοτικοποίηση της επίδρασης της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο.	112
<b>Εικόνα 52.</b>	Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στα ελεύθερα λιπαρά οξέα του πλάσματος.	114
<b>Εικόνα 53.</b>	Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στα λιπαρά οξέα των τριακυλογλυκερολών στο πλάσμα.	116
<b>Εικόνα 54.</b>	Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στα NEFA και τις τριακυλογλυκερόλες στο πλάσμα.	117
<b>Εικόνα 55.</b>	Πηκτώματα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων στον EDL στις ομάδες control και άσκηση.	125
<b>Εικόνα 56.</b>	Πηκτώματα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων στον υποκνημίδιο μυ στις ομάδες control και άσκηση.	126
<b>Εικόνα 57.</b>	Η επίδραση της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στην απόδοση των επιμύων.	129
<b>Εικόνα 58.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα.	131
<b>Εικόνα 59.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ.	133
<b>Εικόνα 60.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στον καρδιακό μυ.	135
<b>Εικόνα 61.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο ήπαρ.	137
<b>Εικόνα 62.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.	139
<b>Εικόνα 63.</b>	Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα (Α), στο γαστροκνήμιο μυ (Β), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Γ), τον υποκνημίδιο μυ (Δ), το ήπαρ (Ε) και τον καρδιακό μυ (ΣΤ).	141

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b>	Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα (mean ± SEM) των προκαταρκτικών πειραμάτων σε 4 επίμυες που θανατώθηκαν πριν ή σε 3 χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DMSO.	49
<b>Πίνακας 2.</b>	Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα (mean ± SEM) των προκαταρκτικών πειραμάτων σε 4 επίμυες που θανατώθηκαν πριν ή σε 3 χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DMSO.	49
<b>Πίνακας 3.</b>	Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ (mean ± SEM) των προκαταρκτικών πειραμάτων σε 4 επίμυες που θανατώθηκαν πριν ή σε 3 χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DMSO.	49
<b>Πίνακας 4.</b>	Συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στο αίμα και τους ιστούς μετά την άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης.	105
<b>Πίνακας 5.</b>	Συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα μετά την άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης.	106
<b>Πίνακας 6.</b>	Συγκεντρώσεις και ποσοστιαία κατανομή των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος των επιμύων (mean ± SEM).	119
<b>Πίνακας 7.</b>	Συγκεντρώσεις και ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος των επιμύων (mean ± SEM).	120
<b>Πίνακας 8.</b>	Στατιστική ανάλυση για τις συγκεντρώσεις και τις ποσοστιαίες κατανομές των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος.	121
<b>Πίνακας 9.</b>	Στατιστική ανάλυση για τις συγκεντρώσεις και τις ποσοστιαίες κατανομές των ελεύθερων λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος.	122
<b>Πίνακας 10.</b>	Επιδράσεις των εκχυλισμάτων σταφυλίων στη δραστικότητα των XO, CAT και SOD.	128
<b>Πίνακας 11.</b>	Πολυφαινολική σύσταση (mg πολυφαινολών/g εκχυλίσματος) εκχυλισμάτων βόστρυχων.	194
<b>Πίνακας 12.</b>	Πολυφαινολική σύσταση (mg πολυφαινολών/g εκχυλίσματος) εκχυλισμάτων στέμφυλων και καρπών.	195

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

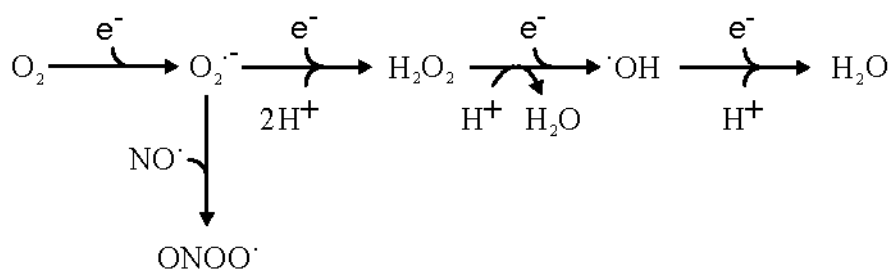
ROS (reactive oxygen species)	δραστικές μορφές οξυγόνου
XOR (xanthine oxidoreductase)	οξειδοαναγωγή της ξανθίνης
XO (xanthine oxidase)	οξειδάση της ξανθίνης
XDH (xanthine dehydrogenase)	δεϋδρογονάση της ξανθίνης
SOD (superoxide dismutase)	υπεροξειδική δισμουτάση
CAT (catalase)	καταλάση
GR (glutathione reductase)	αναγωγή της γλουταθειόνης
GPX (glutathione peroxidase)	υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
TAC (total antioxidant capacity)	ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
GSH (reduced form of glutathione)	ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG (oxidized form of glutathione)	οξειδωμένη γλουταθειόνη
TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)	ουσίες που αντιδρούν με το θειβαρβιτουρικό οξύ
RBCL (red blood cell lysate)	ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα
Hb (hemoglobin)	αιμοσφαιρίνη
MDA (malonyl dialdehyde)	μηλονική διαλδεϋδη
FFA (free fatty acids)	ελεύθερα λιπαρά οξέα
PUFA (polyunsaturated fatty acids)	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SF (saturated fatty acids)	κορεσμένα λιπαρά οξέα
MUFA (monounsaturated fatty acids)	μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NEFA (nonesterified fatty acids)	μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα
TG (triacylglycerols)	τριακυλογλυκερόλες

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

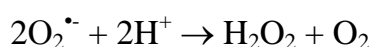
## 1. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς δομές καθώς τείνουν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα άτομα ή μόρια με σκοπό να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα. Διακρίνονται στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο, τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS), που προέρχονται από το άζωτο, τις δραστικές μορφές θείου (RSS), που προέρχονται από το θείο και τις δραστικές μορφές χλωρίου (RCS), που προέρχονται από το χλώριο (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Οι ROS είναι ενώσεις, που προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) με διαδοχικές αντιδράσεις αναγωγής. Όταν το  $O_2$  ανάγεται από ένα ηλεκτρόνιο παράγεται το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), η πρώτη ελεύθερη ρίζα που συναντάται συνήθως στα βιολογικά συστήματα μετά από αντιδράσεις οξειδωσης. Το  $O_2^{\bullet-}$  μπορεί να διασπαστεί και να δώσει γέννηση σε δύο ρίζες υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ). Όταν το  $O_2$  ανάγεται από δύο ηλεκτρόνια παράγεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Η πλήρης αναγωγή του  $O_2$  με προσθήκη τεσσάρων ηλεκτρονίων οδηγεί στην παραγωγή δύο μορίων  $H_2O$  (Simic, 1988). Το  $O_2$  έχει δύο μονήρη ηλεκτρόνια αλλά είναι σχετικά σταθερό διότι αυτά έχουν παράλληλο spin. Η αύξηση, όμως, της ενέργειας μπορεί να αντιστρέψει το spin ενός εκ των δύο ηλεκτρονίων και να οδηγήσει στην παραγωγή του ασταθούς μονήρους οξυγόνου ( $^1O_2$ ). Στην παρακάτω αντίδραση φαίνεται αναλυτικά το μονοπάτι της πλήρους αναγωγής του  $O_2$ .



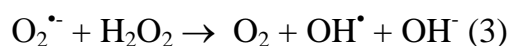
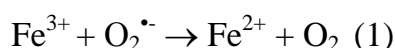
Το  $O_2^{\bullet-}$  δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό απέναντι στα βιολογικά μόρια αλλά όταν βρεθεί σε υδατικό περιβάλλον αντιδρά και μετατρέπεται σε  $H_2O_2$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση.



Μπορεί να σχηματιστεί τόσο από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου στο  $O_2$  όσο και από τα

φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια της δράσης τους. Το  $O_2^{\bullet -}$  παράγεται, επίσης, από τη δράση ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, οι κυκλοξυγενάσες και το κυτόχρωμα P<sub>450</sub>. Έχει, ωστόσο και σηματοδοτικό ρόλο κατά τη διακυτταρική επικοινωνία σε διάφορα είδη κυττάρων (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Το  $OH^{\bullet}$  προκύπτει από τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση και είναι συνήθως ο σίδηρος (Fe) ή ο χαλκός (Cu). Είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με το DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα μέταλλα (Halliwell & Gutteridge, 2007).



Αντιδράσεις Haber-Weiss (1-3) και Fenton (2).

Το  $H_2O_2$  δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό αλλά έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής κι έτσι μπορεί να μεταφέρεται μακριά από το μέρος παραγωγής του διαπερνώντας τις μεμβράνες. Μέσω της αντίδρασης Fenton αντιδρά με ανηγμένα ιόντα μετάλλων και σχηματίζει  $OH^{\bullet}$ . Το  $H_2O_2$  δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε συγκεντρώσεις 10  $\mu$ M. Έχει, ωστόσο και το ρόλο σηματοδοτικού μορίου κατά τη διακυτταρική επικοινωνία σε διάφορα είδη κυττάρων (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ) παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη και είναι πολύ δραστική. Αντιδρά με το  $O_2^{\bullet -}$  και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $ONOO^{-}$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ) και τελικά τις ρίζες  $OH^{\bullet}$  και τα νιτρώδη ( $NO_2^{\bullet}$ ) (Halliwell, 2001). Η ρίζα  $NO^{\bullet}$  είναι βιολογικά πολύ σημαντική, καθώς χρησιμεύει στη μεταγωγή σήματος μεταξύ των κυττάρων, συμμετέχει στην αγγειοσυστολή και είναι νευροδιαβιβαστής (Halliwell & Gutteridge, 2007).



## **1.1. Πηγές ελευθέρων ριζών**

### **1.1.1. Ενδογενείς πηγές**

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ενδογενώς από βιοχημικές διεργασίες με κυριότερη την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Di Meo & Venditti, 2001). Παλαιότερες μελέτες αναφέρουν ότι το 2-5% του  $O_2$ , που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών μετατρέπεται σε  $O_2^{\bullet-}$  στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990; Jenkins & Goldfarb, 1993). Ωστόσο, πιο πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός στην ηρεμία κυμαίνεται από 0,4 ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε ποσοστό 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al., 2002). Κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP, ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Τα κύρια μέρη παραγωγής ROS στην αναπνευστική αλυσίδα είναι τα σύμπλοκα I και III (Sjodin et al., 1990). Συγκεκριμένα, ένα ποσοστό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την αναγωγή του  $O_2$  σε  $O_2^{\bullet-}$  από την ημικινόνη (UQH) της οξειδαναγωγάσης NADH-συνενζύμου Q (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Άλλη ενδογενής πηγή ROS και κυρίως  $H_2O_2$  είναι τα υπεροξειδιοσώματα, μικρά μεμβρανικά κυστίδια με ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης. Επίσης, τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος  $P_{450}$  παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο  $O_2$  και οξειδώνοντας το υπόστρωμα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Κατά τη διάρκεια της άσκησης η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης οδηγεί στην παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$  (Cooper et al., 2002), ενώ και η αυτοοξείδωση της μυοσφαιρίνης μπορεί με ανάλογο τρόπο να απελευθερώσει  $H_2O_2$  (Brantley et al., 1993). Τέλος, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Klebanoff et al., 1988).

### *1.1.2. Εξωγενείς πηγές*

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν και από εξωγενείς πηγές, κυρίως περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η υπεριώδης ακτινοβολία UVB (280-320nm) προκαλεί βλάβες στο δέρμα και τα μάτια, ενώ η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως απόκριση. Ελεύθερες ρίζες παράγονται, επίσης, όταν η χαμηλή θερμοκρασία επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα διότι αυξάνεται ο μεταβολικός ρυθμός (Storey & Storey, 1996). Η διατροφή είναι ένας θεμελιώδης παράγοντας αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών, όταν είναι φτωχή στις απαραίτητες αντιοξειδωτικές βιταμίνες. Η μειωμένη πρόσληψη μετάλλων, επίσης, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ομαλή λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων, των οποίων τα μέταλλα είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες για τη δράση τους. Κάτι τέτοιο συμβαίνει με το μαγγάνιο (Mn), το Cu και τον ψευδάργυρο (Zn) για την SOD, το Fe για την αίμη της καταλάσης (CAT) και το σελήνιο (Se) για την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX). Στις εξωγενείς πηγές των ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται ακόμη το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η άσκηση (Halliwell & Gutteridge, 2007).

### *1.2. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών*

Οι ελεύθερες ρίζες ακολουθούν το φαινόμενο της όρμησης (hormesis), σύμφωνα με το οποίο χαμηλές συγκεντρώσεις τους στο κύτταρο είναι απαραίτητες για ορισμένες θεμελιώδεις διεργασίες. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές που μπορεί να αντιμετωπίσει ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός προκαλούν βλάβες στα βιομόρια.

#### *1.2.1. Θετικές επιδράσεις*

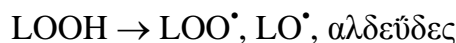
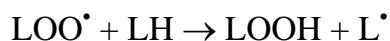
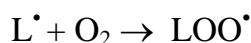
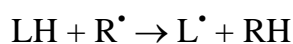
Μία ποσότητα ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για διάφορες σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες, όπως η μεταγωγή σήματος (Ji, 2007) και η έκφραση γονιδίων (Ji et al., 2006). Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν, επίσης, στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins, 1988). Αυτός ο ρόλος τους ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής μετά από έντονη άσκηση, που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (έκκεντρη άσκηση) (Malm, 2001). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), την αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και

στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al., 2002). Συγκεκριμένα, η αναστολή της παραγωγής των ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτότητας των μυϊκών ινών ενώ αύξηση των επιπέδων τους επιτείνει την ένταση της συστολής των μυϊκών ινών (Reid, 2001).

### 1.2.2. Αρνητικές επιδράσεις

Οι πρωτεΐνες είναι στόχος της δράσης των ελευθέρων ριζών όταν αυτές έχουν υψηλή συγκέντρωση. Προκαλούν οξειδωσή τους με το σχηματισμό καρβονυλομάδων (αλδευδών και κετονών) σε ευπαθή προς οξείδωση αμινοξέα όπως η ιστιδίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η προλίνη, ενώ και οι θειολικές ομάδες (-SH) οξειδώνονται σχηματίζοντας θειολικές ρίζες (RS<sup>•</sup>). Οι καρβονυλικές ομάδες δεν αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine, 2002). Η πρωτεϊνική οξείδωση έχει ως συνέπεια την αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και την τροποποίηση ή παύση της λειτουργικότητάς τους (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες σε όλα τα βιομόρια αλλά τα λιπίδια είναι τα πιο ευαίσθητα στην οξειδωτική καταστροφή (Halliwell & Chirico, 1993). Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες οδηγώντας στις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Alessio, 1993). Η οξείδωση των PUFA οδηγεί στην παραγωγή μιας λιπιδικής ρίζας, η οποία ενώνεται με το οξυγόνο και σχηματίζει μια ρίζα περοξυλίου (LOO<sup>•</sup>). Οι ρίζες αυτές οξειδώνουν κι άλλα PUFA και παράγονται λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH), τα οποία διασπώνται σε συζυγή διένια και αλδεύδες, όπως η 4-υδροξυνονενάλη και η μηλονική διαλδεύδη (MDA) (Young & McEneny, 2001; Mylonas & Kouretas, 1999). Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης φαίνονται παρακάτω.



Η λιπιδική υπεροξειδωση αυξάνει τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των μεμβρανών με αποτέλεσμα να οδηγεί συχνά σε κυτταρικό θάνατο.

Εκτός από τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν και το DNA προκαλώντας σπασίματα στις αλυσίδες του και βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βάσεων (Jenkins, 1988). Από τις τροποποιήσεις αυτές παράγεται ένα καλά μελετημένο παραπροϊόν, η 8-υδροξυδεοξυγουανোসίνη (OH8dG), η οποία προκύπτει από την οξειδωση της γουανίνης στη θέση C8 του πουρινικού δακτυλίου. Η ένωση αυτή οδηγεί στην πρόκληση μεταλλάξεων αντικατάστασης γουανίνης από θυμίνη. Τελικά, προκαλούνται μεταλλάξεις, που πιθανόν οδηγούν σε καρκινογένεση και γήρανση (Radak et al., 1999).

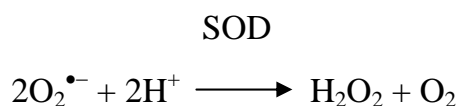
Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στο μυϊκό σύστημα έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση μυϊκού κάματος, που επηρεάζει την απόδοση κατά την άσκηση. Για τη φυσιολογική λειτουργία του μυός απαιτείται σχετικά μικρή ενδοκυτταρική συγκέντρωση ελευθέρων ριζών (Reid, 2001). Όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις επιδρούν στο μιτοχονδριακό DNA των μυϊκών κυττάρων ενώ αναστέλλουν ως ένα βαθμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας (Reid et al., 1992). Οι συσταλτές πρωτεΐνες του μυός (ακτίνη και μυοσίνη) είναι ευαίσθητες στις αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, η οποία μεταβάλλεται από την έντονη παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Τότε, προκαλείται ενδοκυτταρική αύξηση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και απενεργοποίηση ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα, γεγονότα που συμβάλλουν στην εμφάνιση του μυϊκού κάματος (Goldfarb, 1999).

### ***1.3. Αντιοξειδωτικά***

Τα αντιοξειδωτικά περιορίζουν την οξειδωτική καταστροφή στα βιολογικά συστήματα είτε μέσω της αναστολής της παραγωγής των ελευθέρων ριζών είτε μέσω της αδρανοποίησής τους ώστε να μην προσβάλλουν τα βιομόρια. Μπορεί να παράγονται ενδογενώς από τον οργανισμό ή να είναι μόρια, που προσλαμβάνονται κυρίως μέσω της διατροφής. Το ενδογενές σύστημα περιλαμβάνει ενζυμικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες, ενώ αυτά που λαμβάνονται με τη διατροφή είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους (Halliwell & Gutteridge, 2007; Alessio & Hagerman, 2006).

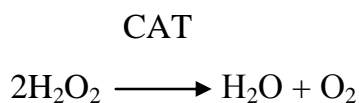
### 1.3.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Όσον αφορά στους ενζυμικούς μηχανισμούς, το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) υπάρχει σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει τη μετατροπή του  $O_2^{\bullet-}$  σε  $H_2O_2$ , όπως δείχνει η παρακάτω αντίδραση.



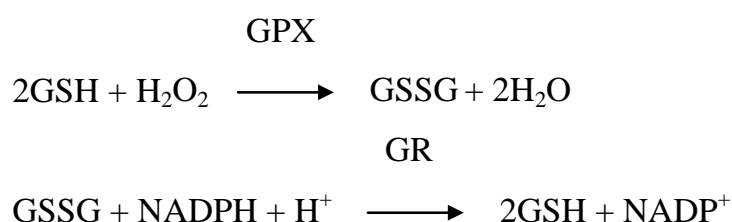
Υπάρχει σε τρεις μορφές, την κυτταροπλασματική που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), τη μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό της κέντρο (MnSOD) και την εξωκυτταρική. Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου  $O_2^{\bullet-}$  από τα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Das et al., 1997).

Η CAT, ένα ακόμα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα και κυρίως στα ερυθροκύτταρα και το ήπαρ (Masters et al., 1986). Ενδοκυτταρικά εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία είναι κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών οδηγώντας στην παραγωγή  $H_2O_2$  (Antunes et al., 2002). Επίσης, υπάρχει στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα. Η CAT καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  σύμφωνα με την αντίδραση:



Το  $H_2O_2$  που παράγεται από τη δράση της SOD διασπάται από την CAT κι έτσι αναστέλλει τόσο τις βλαβερές επιδράσεις του ίδιου στα βιομόρια όσο και τις επιδράσεις του  $OH^{\bullet}$ , στο οποίο μπορεί να μετατραπεί. Η αντιοξειδωτική δράση της CAT και της SOD ευνοεί την αύξηση της διάρκειας ζωής (Orr & Sohal, 1994). Έχει βρεθεί ότι τα δύο αυτά ένζυμα και αντιοξειδωτικά μόρια όπως το ουρικό οξύ έχουν γραμμική ή σχεδόν γραμμική συσχέτιση με τη διάρκεια ζωής στα θηλαστικά (Cutler, 1984).

Η GPX είναι από τα ελάχιστα ένζυμα, που απαιτούν σελήνιο για τη δράση τους. Είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και η δράση της αποτελεί μία εναλλακτική πορεία για τη διάσπαση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Αυτό το κατορθώνει παρουσία της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). Πιο συγκεκριμένα, το  $\text{H}_2\text{O}_2$  οξειδώνει την GSH σε GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη). Το ένζυμο GR, μία φλαβοπρωτεΐνη, ανάγει την GSSG αναγεννώντας την GSH με το NADPH ως αναγωγικό μέσο (Halliwell, 2001). Οι αντιδράσεις αυτές φαίνονται παρακάτω.

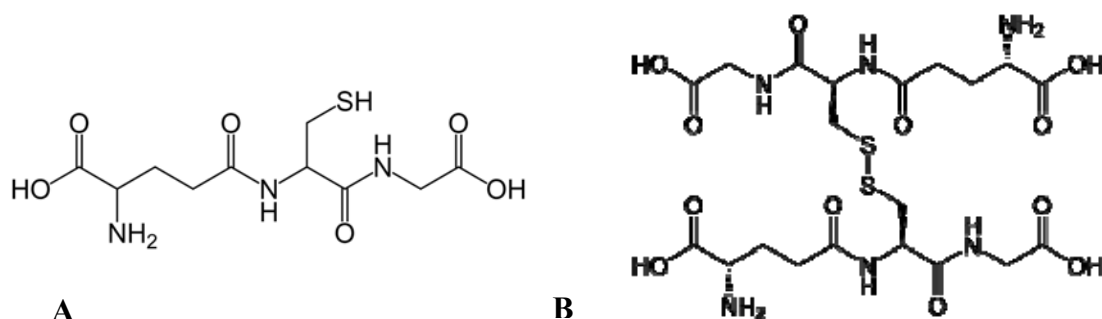


Η GPX και η CAT έχουν την ίδια δράση πάνω στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  αλλά η GPX έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αποτέλεσμα να το αποικοδομεί κατά προτίμηση σε φυσιολογικές συνθήκες (Antunes et al., 2002).

### 1.3.2. Αντιοξειδωτικοί μεταβολίτες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μόρια με κυριότερο, ίσως, τη γλουταθειόνη (GSH). Η GSH είναι η αφθονότερη θειόλη στον οργανισμό και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Η GSH εξουδετερώνει και απευθείας τις ROS ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May et al., 1996). Η GSH αναφέρεται ως ισοένζυμο για ένζυμο όπως η GPX, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό φαρμάκων, ασβεστίου καθώς και στις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης. Ακόμη, συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η απομάκρυνση των ξενοβιοτικών, η διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών και η μεταφορά ελευθέρων ριζών και αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών. Η GSH και η GSSG (Εικόνα 1) βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και ο λόγος τους είναι συχνά ενδεικτικός της παρουσίας οξειδωτικού στρες. Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο, που αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η κυστεΐνη παρέχει τη σουλφυδρυλομάδα, η οποία προσδίδει στο μόριο αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Halliwell & Gutteridge, 2007). Η γλουταθειόνη και οι θειόλες γενικότερα,

όπως το λιποϊκό οξύ, συμμετέχουν στην αναγέννηση αντιοξειδωτικών βιταμινών από τις οξειδωμένες τους μορφές (Serbinova et al., 1992).



**Εικόνα 1.** Η GSH (A) και η GSSG (B).

Στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών μεταβολιτών ανήκει η βιταμίνη E, η οποία είναι λιποδιαλυτή και αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες με κυριότερη την α-τοκοφερόλη (Fuchs et al., 2003). Το ασκορβικό οξύ, επίσης είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη δραστική τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ROS και να ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδρασή τους με τις ROS (Evans, 2000). Το ουρικό οξύ, ως τελικό προϊόν της διάσπασης των πουρινών, είναι το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό του πλάσματος (Wayner et al., 1987). Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά δρουν συνήθως σε συνδυασμό. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η α-τοκοφερόλη, η οποία προστατεύει τις μεμβράνες από την οξειδωτική καταστροφή και αναγεννάται από την οξειδωμένη της μορφή με τη δράση του ασκορβικού οξέος και της GSH (Alessio & Hagerman, 2006). Βασική προϋπόθεση για να δρα ένα μόριο αντιοξειδωτικά είναι αφενός να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου να σχηματίζει σχετικά αδρανή και λιγότερο δραστικά προϊόντα από τις ρίζες που αδρανοποιεί.

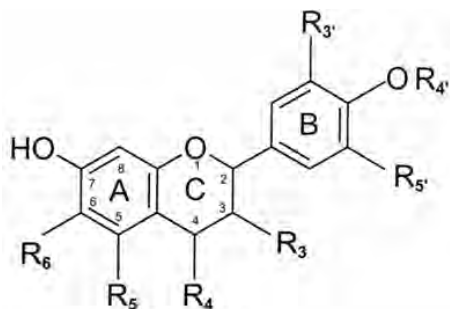
### 1.3.3. Πολυφαινολικές ενώσεις

Μία μεγάλη και πολύ σημαντική κατηγορία αντιοξειδωτικών μεταβολιτών είναι οι πολυφαινολικές ενώσεις.

### *Χημική δομή και ταξινόμηση των πολυφαινολικών ενώσεων*

Οι πολυφαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες είναι μόρια ευρέως καταναμεημένα στο φυτικό βασίλειο. Αποτελούνται από έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο, οι άνθρακες του οποίου είναι συνδεδεμένοι με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και πολλές φορές βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών. Τα κύρια σάκχαρα με τα οποία είναι συνδεδεμένες οι πολυφαινόλες είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη. Ορισμένες πολυφαινόλες είναι διαλυτές στο νερό, άλλες μόνο σε οργανικούς διαλύτες ενώ άλλες είναι δεν είναι διαλυτές σε κανένα διαλύτη. Έχουν πολύ σημαντικές ιδιότητες καθώς προστατεύουν τα φυτά από τις δυσμενείς επιδράσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών και των παθογόνων μικροοργανισμών ενώ σε αυτές οφείλεται το χρώμα των φυτών (Manach et al., 2004). Έχουν βρεθεί πάνω από 8000 πολυφαινολικές ενώσεις στο φυτικό βασίλειο. Οι πολυφαινόλες διαιρούνται σε 10 τουλάχιστον κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των βενζολικών δακτυλίων και των ομάδων με τις οποίες είναι συνδεδεμένοι οι άνθρακές τους.

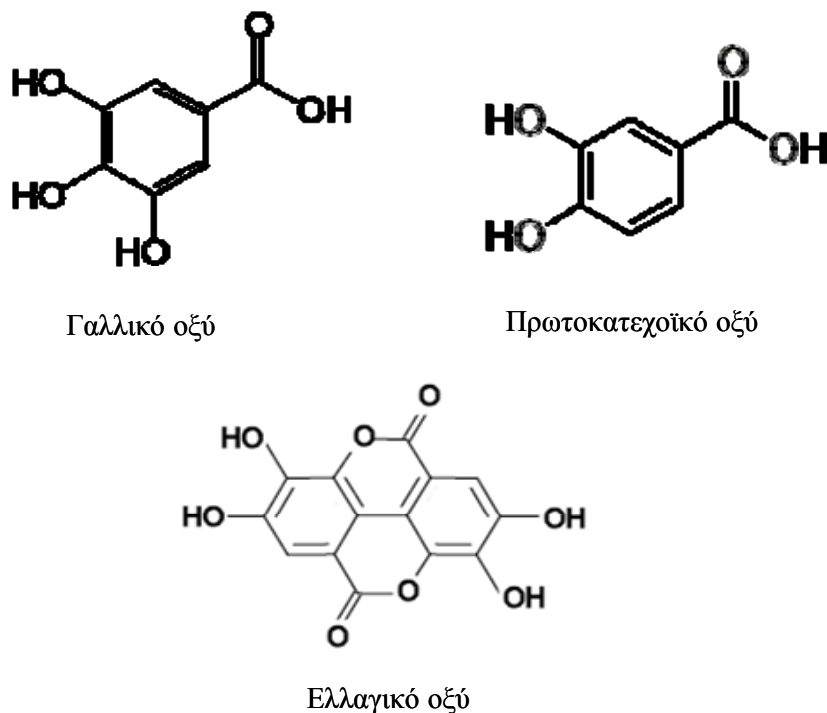
Η μεγαλύτερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία των πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, η κύρια ομάδα χρωστικών που απαντώνται στα φυτά. Η κατηγορία αυτή περιέχει πάνω από 5000 γνωστά μόρια ενώ μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε 6 υποκατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες), τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβονόνες. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους με 15 άτομα άνθρακα, οι οποίοι συνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο και έχουν πολλούς πιθανούς υποκαταστάτες (Εικόνα 2). Βρίσκονται συνήθως με τη μορφή γλυκοζιτών και, ανάλογα με το σάκχαρο, τροποποιούνται και οι ιδιότητές τους (Manach et al., 2004). Τα σταφύλια και τα προϊόντα τους αποτελούν κύρια πηγή των φλαβονοειδών (Manach et al., 2004).



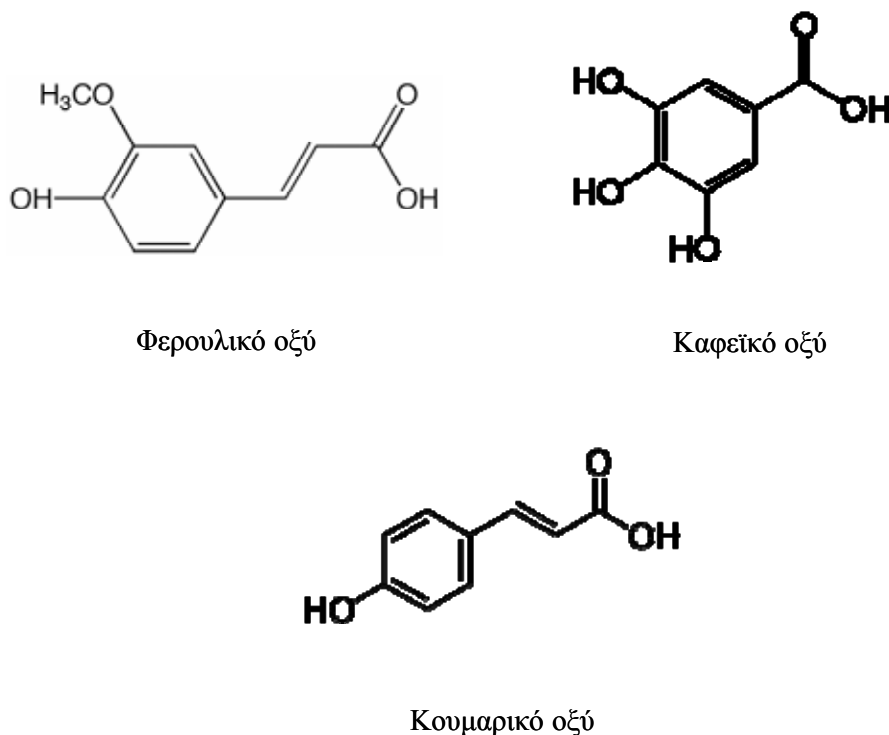
**Εικόνα 2.** Δομή των φλαβονοειδών. Διακρίνονται οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι Α και Β και ο πυρανικός δακτύλιος C, με τον οποίο συνδέονται.



Μία ακόμα πολύ σημαντική κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, των οποίων η δομή είναι απλούστερη από αυτή των φλαβονοειδών. Έχουν έναν μόνο βενζολικό δακτύλιο και διακρίνονται σε υδροξυβενζοϊκά οξέα (Εικόνα 3), τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και υδροξυκινναμικά οξέα, που είναι παράγωγα του κινναμικού οξέος (Εικόνα 4). Βρίσκονται, όπως και τα φλαβονοειδή, σε υψηλές συγκεντρώσεις στα σταφύλια και το κρασί. Το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το ελλαγικό οξύ είναι από τους πιο γνωστούς εκπροσώπους των υδροξυβενζοϊκών οξέων ενώ το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ ανήκουν στα υδροξυκινναμικά οξέα (Soleas et al., 1997; Manach et al., 2004).

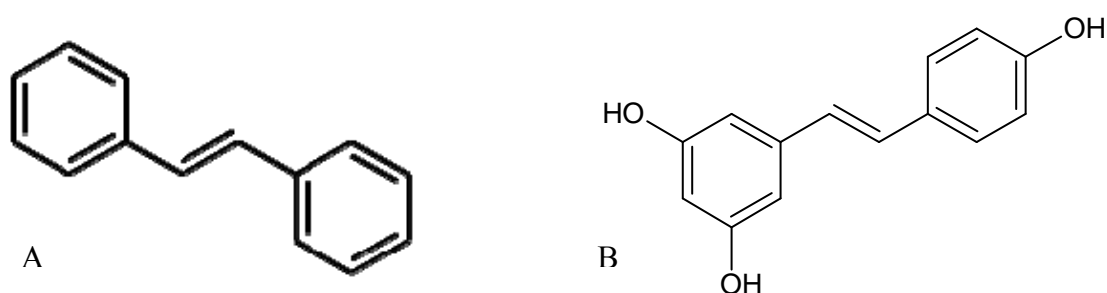


**Εικόνα 3.** Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυβενζοϊκών οξέων.



**Εικόνα 4.** Η χημική δομή των τριών κυριότερων υδροξυκινναμικών οξέων.

Εκτός από τα φαινολικά οξέα, ακόμα μία κατηγορία πολυφαινολών που ανήκουν στα μη φλαβονοειδή είναι τα στυλβενοειδή. Δομικά, αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με μία γέφυρα μεθυλενίου (Εικόνα 5). Από τα πιο χαρακτηριστικά στυλβένια είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία είναι παρούσα στα σταφύλια και το κρασί σε υψηλές συγκεντρώσεις (Soleas et al., 1997).



**Εικόνα 5.** Η χημική δομή των στυλβενοειδών (A) και της *trans*-ρεσβερατρόλης (B).

#### *Βιοσύνθεση και βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολικών ενώσεων*

Τα φλαβονοειδή και τα υδροξυκινναμικά οξέα παράγονται από το φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ. Αυτό μετατρέπεται σε φαινυλαλανίνη και ακολουθεί η μετατροπή της σε κινναμικό οξύ μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέως (Soleas

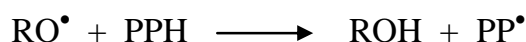
et al., 1997). Τα δύο κυριότερα υδροξυκιναμικά οξέα, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ παράγονται από το π-κουμαρικό οξύ, το οποίο παράγεται από το κιναμικό οξύ. Όσον αφορά στο κυριότερο στυλβένιο, την *trans*-ρεσβερατρόλη, παράγεται μέσω συμπύκνωσης ενός μορίου π-κουμάρυλο-CoA με τρία μόρια μηλόνυλο-CoA μέσω της δράσης της συνθάσης της ρεσβερατρούλης (Soleas et al., 1997).

Όπως προαναφέρθηκε, οι πολυφαινόλες στην πλειοψηφία τους βρίσκονται γλυκοζυλιωμένες ή ως πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους γεγονός που εμποδίζει την απορρόφησή τους από τον οργανισμό. Για να απορροφηθούν και να χρησιμοποιηθούν, θα πρέπει να υδρολυθούν. Όταν οι πολυφαινόλες είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα, τότε υδρολυτικά ένζυμα του λεπτού εντέρου όπως οι β-γλυκοζιδάσες ενεργοποιούνται για την απομάκρυνση του σακχάρου. Μέσω αυτής της διαδικασίας οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε απλούστερα οργανικά οξέα, τα οποία απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ. Οι πολυφαινόλες που δε μεταβολίζονται από το λεπτό έντερο φτάνουν στο παχύ έντερο και διασπώνται από τη μικροχλωρίδα του. Αυτό δεν ισχύει για τις ανθοκυανίνες καθώς βρίσκονται στον οργανισμό σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Όσον αφορά στις πολυφαινόλες που βρίσκονται με τη μορφή πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους (ταννίνες), κατά το μεταβολισμό τους διασπώνται σε μικρότερες ενώσεις που μπορούν πιο εύκολα να απορροφηθούν (Manach et al., 2004; Scalbert & Williamson, 2000). Μετά την απομάκρυνση του σακχάρου ενεργοποιούνται τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού. Τα κυριότερα ένζυμα είναι οι κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες, οι γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες και οι σουλφοτρανσφεράσες, οι οποίες προσθέτουν μεθυλικές, γλυκουρονικές και θεικές ομάδες, αντίστοιχα (Kroon et al., 2004). Τελικά, οι πολυφαινόλες καταλήγουν μέσω της κυκλοφορίας στα ούρα και τη χολή, απ' όπου απεκκρίνονται (Manach et al., 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι η *in vivo* διαθεσιμότητα έχει μελετηθεί μόνο για λίγες πολυφαινόλες (Williamson & Manach, 2005; Rechner et al., 2002). Είναι, όμως, αποδεκτό ότι η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα δεν ξεπερνά το 1 μΜ μετά από κατανάλωση ποσότητας 10-100 mg (Scalbert & Williamson, 2000).

#### *Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων*

Έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την προσφορά ενός ατόμου

υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, τις οποίες μετατρέπουν σε σταθερά μόρια, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



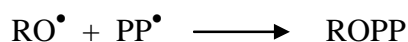
RO<sup>•</sup>: η ελεύθερη ρίζα

PPH: η πολυφαινόλη

ROH: το σταθερό προϊόν της ρίζας

PP<sup>•</sup>: η φαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σχετικά σταθερή και μπορεί να αντιδράσει και με άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση, ώστε να αποτρέψει τις βλαβερές επιδράσεις τους στα βιομόρια.



ROPP: το σταθερό προϊόν μετά τη δράση της πολυφαινόλης

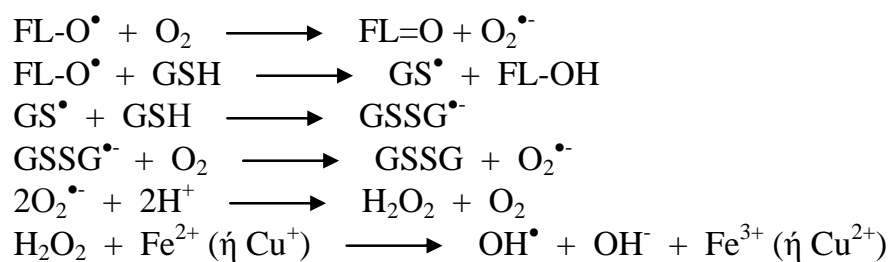
Εκτός από την απευθείας αλληλεπίδρασή τους με τις ελεύθερες ρίζες, οι πολυφαινόλες ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση δεσμεύοντας χηλικά ιόντα Cu και Fe, τα οποία μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al., 2001).

Πολλές εργασίες έχουν ασχοληθεί με την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Έχει, λοιπόν, βρεθεί ότι η κατανάλωση πολυφαινολών οδήγησε σε μειωμένη εμφάνιση καρδιοαγγειακών παθήσεων (Hertog et al., 1995, 1997) καθώς εμποδίζουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον, αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P<sub>450</sub> και ενζύμων, όπως η κυκλοξυγενάση, η οξειδάση της ξανθίνης (XO) και η λιποξεγενάση με οξειδωτική δράση (Ferguson 2001; Rice-Evans et al., 1996; Cotelle, 2001). Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οδηγεί στην παρεμπόδιση της οξειδωτικής καταστροφής του DNA και στην πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου (Hertog et al., 1996; Kagan et al., 1998; Cotelle, 2001; Wang et al., 1999). Οι πολυφαινόλες, με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα την κερκετίνη και την κατεχίνη, εμποδίζουν τη νιτροσυλίωση μορίων, τα οποία έχουν καρκινογόνο δράση, όπως βρέθηκε μετά από πειράματα που έγιναν τόσο σε ζώα όσο και στον άνθρωπο (Pignatelli et al., 1980). Επίσης, αναστέλλουν τη δράση της

συνθάσης του NO, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις από τη δράση του ενζύμου αυτού (Ferguson et al., 1996).

#### *Οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων*

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας φαινολικής ρίζας. Συνήθως, η ρίζα αυτή δεν είναι ιδιαίτερα δραστική, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις που έχει υψηλή δραστικότητα και έτσι μπορεί να είναι η αιτία για την οξειδωτική τους δράση. Ορισμένα φλαβονοειδή, όταν δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, παράγουν αρκετά ασταθείς φαινολικές ρίζες. Οι ρίζες αυτές αντιδρούν με το O<sub>2</sub> ή την GSH και παράγουν O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, το οποίο σχηματίζει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσω της συμμετοχής του στην αντίδραση Fenton (Cotelle, 2001).



FL-O<sup>•</sup>: η ρίζα του φλαβονοειδούς

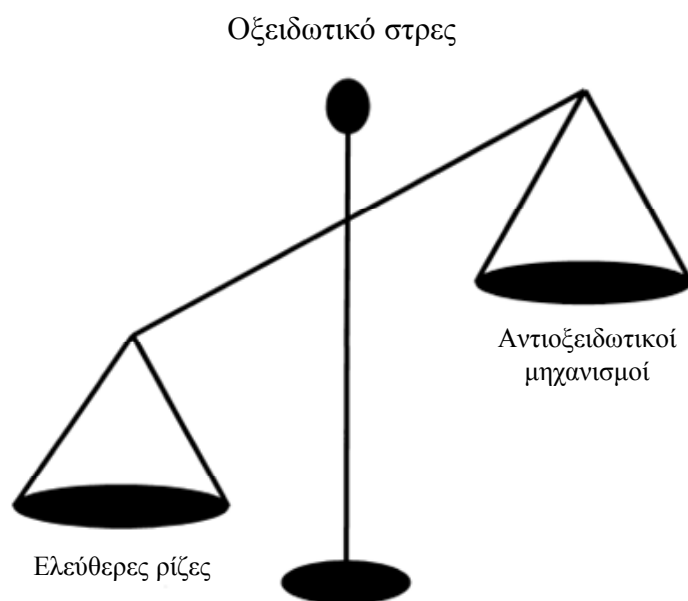
Ένας ακόμα μηχανισμός της οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών σχετίζεται με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης Cu και Fe. Τα μέταλλα αυτά συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανακύκλωσης των φαινολικών ριζών με ταυτόχρονο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Αρχικά, η πολυφαινόλη μετατρέπει τον Cu<sup>2+</sup> σε Cu<sup>+</sup> και η ίδια μετατρέπεται σε ρίζα, η οποία με την αντίδρασή της με το O<sub>2</sub> οδηγεί στην παραγωγή O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> αντιδρά με μία άλλη πολυφαινόλη ανακυκλώνοντας τη φαινολική ρίζα και σχηματίζοντας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το οποίο συμμετέχει στην αντίδραση Fenton με τα Cu<sup>+</sup> σχηματίζοντας την ισχυρή οξειδωτική OH<sup>•</sup> (Sakihama et al., 2002). Τέλος, οι πολυφαινόλες μπορούν να προσβάλλουν και το DNA πιο άμεσα. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει δείχτει ότι φαινολικές ρίζες προερχόμενες από την κερκετίνη προκάλεσαν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA σε πυρήνες ηπατικών κυττάρων επιμύων (Sahu & Gray, 1997).

#### 1.4. Οξειδωτικό στρες

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ή συνθήκες ηρεμίας οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής (Εικόνα 6) μπορεί να προέρθει από δύο βασικές αιτίες (Halliwell, 2001). Η πρώτη σχετίζεται με τη μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών. Μεταλλάξεις περιορίζουν τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επίσης, πολλά ξеноβιοτικά απομακρύνονται μέσω της δέσμευσής τους από την GSH. Αν αυτά, όμως, εισέρθουν στο κύτταρο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, η GSH καταναλώνεται κι έτσι προκαλείται οξειδωτικό στρες ακόμα κι αν τα συγκεκριμένα ξеноβιοτικά δεν παράγουν ελεύθερες ρίζες. Η μειωμένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών με τη διατροφή είναι ακόμη μία αιτία εμφάνισης οξειδωτικού στρες.

Η δεύτερη αιτία έγκειται στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαιτίας της έκθεσης σε οξειδωτικούς παράγοντες. Επίσης, ο μεταβολισμός ορισμένων ξеноβιοτικών που δεν είναι ελεύθερες ρίζες είναι πιθανό να οδηγήσει στην παραγωγή μεταβολιτών, που είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά.

Το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί τόσο αιτία όσο και αποτέλεσμα ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001).



**Εικόνα 6.** Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες.

## **2. Άσκηση**

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η τακτική άσκηση προάγει την ευεξία, συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, καρκίνου και διαβήτη και αυξάνει τη διάρκεια ζωής (Halliwell & Gutteridge, 2007; McCarter, 2000). Οι θετικές αυτές επιδράσεις της άσκησης οφείλονται σε προσαρμογές (Gomez-Cabrera et al., 2005), σε βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και σε αύξηση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

### **2.1. Ο μεταβολισμός κατά τη διάρκεια της άσκησης**

Ο οργανισμός χρησιμοποιεί λιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες για την παροχή ενέργειας κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η είσοδος στον οργανισμό και η χρησιμοποίηση των μορίων αυτών ως αποθηκών ενέργειας είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών συστημάτων. Η γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα που προσλαμβάνονται από την τροφή απορροφώνται από το λεπτό έντερο και καταλήγουν στην κυκλοφορία. Ίδια κατάληξη έχουν και τα λιπαρά οξέα που προέρχονται από τα λιποκύτταρα. Η γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα μεταφέρονται με το αίμα στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών κυττάρων και χρησιμεύουν ως πηγές ενέργειας. Η ενέργεια παράγεται είτε αναερόβια μέσω της γλυκόλυσης, όπου αποικοδομούνται γλυκόζη και γλυκογόνο, είτε αερόβια μέσω του κύκλου του Krebs, όπου καταναλώνονται τα μεταβολικά προϊόντα της γλυκόλυσης και τα λιπαρά οξέα που αποδομούνται κατά τη β-οξείδωση. Η ενεργοποίηση της αερόβιας διεργασίας απαιτεί οξυγόνο, που μεταφέρεται με την αιμοσφαιρίνη του αρτηριακού αίματος στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Το διοξείδιο του άνθρακα ως προϊόν των καύσεων μεταφέρεται με το φλεβικό αίμα και αποβάλλεται από τους πνεύμονες. Γενικά, τα λίπη αποτελούν το 80% της αποθηκευμένης ενέργειας του σώματος, οι πρωτεΐνες το 19% και οι υδατάνθρακες το 1% (Taylor et al., 1996).

#### **2.1.1. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της άσκησης**

Οι μεγαλύτερες κατηγορίες λιπιδίων είναι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και τα PUFA, ενώ τα PUFA διακρίνονται σε  $\omega 3$  και  $\omega 6$  λιπαρά οξέα. Τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν τα  $\omega 3$  και  $\omega 6$  και γι' αυτό πρέπει να τα προσλαμβάνουν μέσω της τροφής. Τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (NEFA) χρησιμεύουν ως καύσιμα για τους σκελετικούς μύες και ειδικότερα εκείνους που περιέχουν οξειδωτικές μυϊκές ίνες. Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα είναι πρόδρομοι για

μόρια, που έχουν σηματοδοτικό ρόλο όπως τα εικοσανοειδή (προσταγλανδίνες, θρομβοξανές, προστακυκλίνες και λευκοτριένια). Τα λιπαρά οξέα, που απελευθερώνονται από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών των λιποκυττάρων και των ενδομυϊκών τριακυλογλυκερολών (TG) είναι η κύρια πηγή ενέργειας των σκελετικών μυών σε άσκηση μικρής ή μεσαίας έντασης (Horowitz, 2003). Οι TG αποτελούν το 90-99% των λιπιδίων του λιπώδους ιστού στα ζώα της ξηράς και αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη αποθήκη καυσίμου στον οργανισμό (Jeanrenaud, 1965). Είναι αποθηκευμένες στο λιπώδη ιστό (17500 mmol σε έναν αδύνατο ενήλικα άνδρα), το σκελετικό μυ (300 mmol) και σε πολύ μικρότερο ποσοστό στο πλάσμα (0,5 mmol). Το συνολικό ποσό ενέργειας που είναι αποθηκευμένο στη μορφή TG είναι 560 MJ, δηλαδή 60 φορές μεγαλύτερο από το ποσό που είναι αποθηκευμένο με τη μορφή γλυκογόνου (9 MJ). Στην ηρεμία, το ποσό των λιπαρών οξέων που ελευθερώνεται από το λιπώδη ιστό υπερβαίνει το ποσό των λιπαρών οξέων που οξειδώνεται. Ήπιας ή μεσαίας έντασης άσκηση (25-65% της  $VO_{2max}$ ) προκαλεί 5-10 φορές αύξηση της οξείδωσης των λιπιδίων σχετικά με την ηρεμία. Αυτό οφείλεται στις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις των μυών και την αυξημένη διαθεσιμότητα των λιπαρών οξέων. Η αυξημένη διαθεσιμότητα του αποθέματος των λιπαρών οξέων παρέχεται από τη λιπόλυση των TG του λιπώδους ιστού, η οποία αυξάνεται 2-3 φορές λόγω της αυξημένης β-αδρενεργικής διέγερσης (McArdle et al., 1991; Klein et al., 1994). Η οξείδωση των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της εξαντλητικής άσκησης καθυστερεί την εξάντληση του γλυκογόνου και την υπογλυκαιμία. Η χρήση των λιπαρών οξέων ως καυσίμου απαιτεί την υδρόλυση των TG (λιπόλυση) από το λιπώδη ιστό, το σκελετικό μυ και το πλάσμα και την είσοδο των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια του σκελετικού μυός για οξείδωση (Horowitz & Klein, 2000).

Πιο συγκεκριμένα, η έντονη άσκηση αυξάνει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα NEFA του πλάσματος τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Σχετικά με το λόγο ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα (U/S), η βιβλιογραφία δείχνει ότι αυξάνονται σε ποσοστό 22% κατά μέσο όρο στα NEFA του πλάσματος μετά από έντονη άσκηση στα ζώα και τον άνθρωπο (Nikolaidis & Mougios, 2004). Η χρόνια άσκηση αυξάνει τα PUFA και τα ω6 λιπαρά οξέα, μειώνει τα MUFA του λιπώδους ιστού και το λόγο U/S στα λιπίδια του ήπατος (Van der Vusse et al., 1996). Οι επιδράσεις της άσκησης στη σύσταση των λιπαρών οξέων των λιπιδίων των ιστών είναι ανεξάρτητες και από τον τύπο των μυϊκών ινών. Ωστόσο, δεν υπάρχει ομοφωνία στη βιβλιογραφία σχετικά με τις επιδράσεις της έντονης ή χρόνιας άσκησης στο



προφίλ των λιπαρών οξέων και πιο συγκεκριμένα των PUFA, των  $\omega 6$ ,  $\omega 3$ , του λόγου  $\omega 6/\omega 3$  και των NEFA στους ιστούς (Nikolaidis & Mougios, 2004).

### *2.1.2. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων κατά τη διάρκεια της άσκησης*

Είναι πλέον αποδεκτό ότι σε χαμηλής έντασης άσκηση η απαιτούμενη ενέργεια παρέχεται κυρίως από την οξείδωση των λιπιδίων, ενώ, όταν η ένταση της άσκησης αυξάνεται, οι υδατάνθρακες είναι η κύρια πηγή ενέργειας (Brooks & Mercier, 1994). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ενέργεια από τη διάσπαση των υδατανθράκων παράγεται με διπλάσια σχεδόν ταχύτητα σε σύγκριση με τη διάσπαση των λιπιδίων. Το γλυκογόνο που είναι αποθηκευμένο στο ήπαρ και τους μύες συντίθεται από τους υδατάνθρακες της τροφής με τη διαδικασία της γλυκογονοσύνθεσης. Η αντίθετη διαδικασία, η γλυκογονόλυση, επιταχύνεται κατά τη διάρκεια της άσκησης λόγω αυξημένης ποσότητας των  $\text{Ca}^{2+}$ , της έκκρισης της επινεφρίνης, της συγκέντρωσης των φωσφορικών ομάδων ( $\text{P}_i$ ), του AMP και του IMP και αντίστοιχης μείωσης του ATP. Μετά την άσκηση τα επίπεδα του μυϊκού γλυκογόνου μειώνονται. Η επανασύνθεσή του αρχίζει αμέσως μετά από την εξάντληση των αποθεμάτων του και φτάνει το 50% μετά από 5 h ενώ ολοκληρώνεται μετά από 24 h (Sherman, 1987; Coyle & Montain, 1992).

Προϊόντα της γλυκογονόλυσης είναι η 1-φωσφορική γλυκόζη και η γλυκόζη, οι οποίες μέσω της γλυκόλυσης παράγουν πυροσταφυλικό οξύ και ATP. Η άσκηση αυξάνει το ρυθμό της γλυκόλυσης έως και 100 φορές στο μυ. Επίσης, κατά την άσκηση αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκόζης από τους μύες λόγω της αυξημένης αιματικής ροής και της αύξησης των μεταφορέων γλυκόζης εντός του μυϊκού κυττάρου. Στις μυϊκές ίνες υπάρχουν τρεις ισομορφές του μεταφορέα γλυκόζης, οι GLUT1, GLUT3 και GLUT4. Ο GLUT4 είναι η πιο άφθονη ισομορφή και κατά τη μυϊκή συστολή μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα την είσοδο της γλυκόζης από το αίμα στο μυϊκό κύτταρο (Brozinick et al., 1994). Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα κατά την άσκηση μπορεί να μειωθεί ή να αυξηθεί ανάλογα με το είδος της άσκησης και το μέγεθος των αποθεμάτων του ηπατικού γλυκογόνου. Ελαφριά άσκηση δεν την επηρεάζει σημαντικά, ενώ μέτρια ή έντονη άσκηση τείνει αρχικά να την αυξάνει και στη συνέχεια να τη μειώνει ακόμη και κάτω από την αρχική τιμή, αν η άσκηση είναι παρατεταμένη. Ωστόσο, ο οργανισμός διατηρεί μία σχετικά σταθερή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα καθώς είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία του εγκεφάλου (απαιτεί συνεχή παροχή γλυκόζης από το αίμα) και των

ερυθροκυττάρων. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης της γλυκόζης είναι ορμονικός και βασίζεται στην ινσουλίνη και τη γλυκαγόνη.

### *2.1.3. Διάσπαση του γλυκογόνου κατά την άσκηση*

Η ταχύτητα της γλυκογονόλυσης στο μυ σε κατάσταση ηρεμίας είναι χαμηλή ενώ σε περιβάλλον άσκησης η ταχύτητά της αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι λόγω της υδρόλυσης του ATP στο σαρκόπλασμα αυξάνεται η συγκέντρωση των  $P_i$ , που είναι το υπόστρωμα της πρώτης αντίδρασης της γλυκογονόλυσης. Επίσης, υπεύθυνη για αυτή τη διαδικασία είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των  $Ca^{2+}$  λόγω της απελευθέρωσής τους από το σαρκοπλασματικό δίκτυο κατά τη μυϊκή συστολή. Τα  $Ca^{2+}$  συνδέονται με την κινάση της φωσφορυλάσης και την ενεργοποιούν. Η ενεργοποιημένη κινάση φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση β (ανενεργός μορφή) και τη μετατρέπει στην ενεργή μορφή φωσφορυλάση α (Alessio & Hagerman, 2006).

Επίσης, κατά την άσκηση αυξάνεται η αναλογία AMP/ATP κι έτσι ενεργοποιείται η μετατροπή της φωσφορυλάσης στην ενεργή της μορφή. Επιπλέον, η φωσφορυλάση ενεργοποιείται από την επινεφρίνη, η έκκριση της οποίας από το μυελό των επινεφριδίων εντείνεται λόγω της άσκησης. Η επινεφρίνη ενεργοποιεί το ένζυμο και όταν ο μυς βρίσκεται σε ηρεμία αλλά έχει μικρότερη επίδραση στη γλυκογονόλυση (Ren et al., 1989). Μελέτες με ραδιοσημασμένη γλυκόζη έχουν δείξει ότι η σύνθεση του γλυκογόνου συνεχίζεται ακόμη και όταν λαμβάνει χώρα η διάσπαση του γλυκογόνου κατά τη μυϊκή σύσπαση (Nesher et al., 1985). Εναλλακτικά, ο βαθμός της γλυκογονόλυσης μπορεί να εξαρτάται από την τροφοδοσία από άλλα μεταβολικά μονοπάτια (Ren et al., 1989).

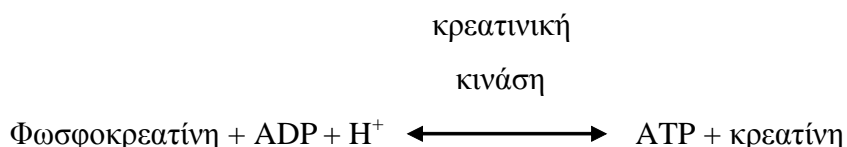
### *2.1.4. Μυϊκό και ηπατικό γλυκογόνο*

Το μυϊκό γλυκογόνο αποτελεί άμεση πηγή ενέργειας για την επίτευξη των κινήσεων. Σε αντίθεση με τη γρήγορη αύξηση του μυϊκού γλυκογόνου, το ηπατικό γλυκογόνο παραμένει αισθητά μειωμένο μέχρι και 3 h μετά την εξαντλητική άσκηση απουσία εξωγενούς παροχής υδατανθράκων (Fell et al., 1980). Ο λόγος της γρήγορης ανασύνθεσης του μυϊκού γλυκογόνου μετά την άσκηση δεν είναι μόνο η αυξημένη ενεργότητα της συνθάσης του γλυκογόνου, αλλά και η αυξημένη διαπερατότητα του σκελετικού μυός στη γλυκόζη (Fell et al., 1980). Ο ρόλος του ηπατικού γλυκογόνου είναι να συντηρεί τη συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος σε σχετικά σταθερά

επίπεδα και να προμηθεύει με γλυκόζη ολόκληρο το κεντρικό νευρικό σύστημα για την κάλυψη των μεταβολικών αναγκών. Απουσία εξωγενούς παροχής υδατανθράκων τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος διατηρούνται σε φυσιολογικά επίπεδα μέσω της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης, που συμβαίνουν στο ήπαρ (Fell et al., 1980). Η παραγωγή του ηπατικού γλυκογόνου ελέγχεται από την ινσουλίνη και τη γλυκαγόνη και από τις κατεχολαμίνες επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη.

#### *2.1.5. Η επιλογή της πηγής ενέργειας εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης*

Το ATP δίνει την ενέργεια στη μυοσίνη να συσπαστεί ώστε να μετατρέψει τη χημική ενέργεια σε κινητική. Η πρώτη και άμεση πηγή ATP είναι η φωσφοκρεατίνη, η οποία διασπάται και δίνει τη φωσφορική ομάδα της στο ADP για το σχηματισμό του ATP σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, που καταλύεται από την κρεατινική κινάση.



Ωστόσο, το ATP μπορεί να δώσει ενέργεια για τη μυϊκή σύσπαση μόνο για 5-6 sec, χρόνος για τον οποίο μπορεί να διατηρηθεί η μέγιστη ταχύτητα σε αγώνα σπριντ. Για έναν αγώνα απόστασης 100 m ενεργοποιούνται η φωσφοκρεατίνη και η αναερόβια γλυκόλυση. Η γλυκόλυση παρέχει ATP σε μεγάλες ποσότητες αλλά με πιο αργό ρυθμό σχετικά με τη διάσπαση της φωσφοκρεατίνης. Το σύστημα του γαλακτικού οξέος γίνεται η κύρια πηγή ενέργειας σε άσκηση διάρκειας από 7 sec μέχρι 1 min περίπου. Σε αγώνα σπριντ διάρκειας περίπου 10sec η συγκέντρωση του ATP στο μυ πέφτει από 5,2 σε 3,6 mM. Κατά την αναερόβια γλυκόλυση η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξάνεται από 1,6 σε 8,3 mM ενώ πέφτει το pH του αίματος από 7,42 σε 7,24 λόγω της ταυτόχρονης απελευθέρωσης  $\text{H}^+$  από το σκελετικό μυ (Halliwell & Gutteridge, 2007; Alessio & Hagerman, 2006).

Για τρέξιμο 1000 m η κύρια πηγή ενέργειας δεν μπορεί να είναι η ίδια αφενός μεν διότι η φωσφοκρεατίνη καταναλώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα, αφετέρου δε επειδή θα προκληθεί οξέωση στο αίμα λόγω της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος. Η πλήρης οξείδωση του μυϊκού γλυκογόνου σε  $\text{CO}_2$  αυξάνει την παραγωγή

ενέργειας αλλά η αερόβια αυτή διαδικασία είναι αρκετά πιο αργή από την αναερόβια γλυκόλυση. Ωστόσο, όταν η απόσταση αυξάνεται τότε συμμετέχει περισσότερο η οξειδωτική φωσφορυλίωση στην παραγωγή ενέργειας. Το ενεργειακό σύστημα, που στηρίζεται στην αερόβια διάσπαση των υδατανθράκων, των λιπιδίων και (σε μικρό βαθμό) των πρωτεϊνών παρέχει απεριόριστη ενέργεια, αλλά με μικρότερη ταχύτητα από εκείνη των δύο προηγούμενων συστημάτων. Έτσι, επικρατεί σε οποιαδήποτε άσκηση διαρκεί πάνω από 1 min. Εκτός από τις ενδομυϊκές πηγές, ενέργεια μέσω του συστήματος του οξυγόνου προσφέρουν το γλυκογόνο και η γλυκόζη του ήπατος, καθώς και τα τριγλυκερίδια του λιπώδους ιστού.

Στο μαραθώνιο απαιτείται η συνεργασία ανάμεσα στο σκελετικό μυ, το ήπαρ και το λιπώδη ιστό για να παραχθεί η απαιτούμενη ενέργεια. Το ηπατικό γλυκογόνο βοηθάει στην αναπλήρωση του μυϊκού γλυκογόνου αλλά η συνολική ποσότητα γλυκογόνου του οργανισμού μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μέρους του ATP και πιο συγκεκριμένα 103 mol από τα 150 mol που απαιτούνται στον άνθρωπο. Έτσι, μεγαλύτερες ποσότητες ATP παράγονται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων, που προέρχονται από τη διάσπαση του λίπους του λιπώδους ιστού. Ωστόσο, ο ρυθμός παραγωγής ATP είναι μικρότερος σε σχέση με την οξείδωση του γλυκογόνου και 10 φορές μικρότερος σε σχέση με τη διάσπαση της φωσφοκρεατίνης. Οι δύο αυτοί αερόβιοι μηχανισμοί παραγωγής ενέργειας δε δρουν ανεξάρτητα, αλλά ταυτόχρονα και η ρύθμισή τους είναι αρκετά πολύπλοκη με στόχο τη διατήρηση σχετικά σταθερής της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η πτώση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε αύξηση του λόγου γλυκαγόνη/ινσουλίνη, ο οποίος ενεργοποιεί την είσοδο των λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό στο μυ (Halliwell & Gutteridge, 2007). Εκεί, διασπώνται μέσω της β οξείδωσης σε ακετυλοσυνένζυμο Α και CO<sub>2</sub>. Η αυξημένη συγκέντρωση του ακετυλοσυνενζύμου Α μειώνει τη δραστηριότητα της δεϋδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος, ώστε να αποτραπεί η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλοσυνένζυμο Α. Τότε, η οξείδωση των λιπαρών οξέων μειώνει την είσοδο της γλυκόζης στον κύκλο του κιτρικού οξέος και την αναπνευστική αλυσίδα και τελικά την κατανάλωσή της (Halliwell & Gutteridge, 2007; Alessio & Hagerman, 2006). Τελικά, όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση της άσκησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η χρησιμοποίηση υδατανθράκων, ενώ, όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της άσκησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η χρησιμοποίηση λιπιδίων ως πηγής ενέργειας.

## **2.2. Πηγές ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση**

Πέρα από τις ευεργετικές επιδράσεις της στην υγεία, η άσκηση οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσα από ορισμένα βασικά βιοχημικά μονοπάτια.

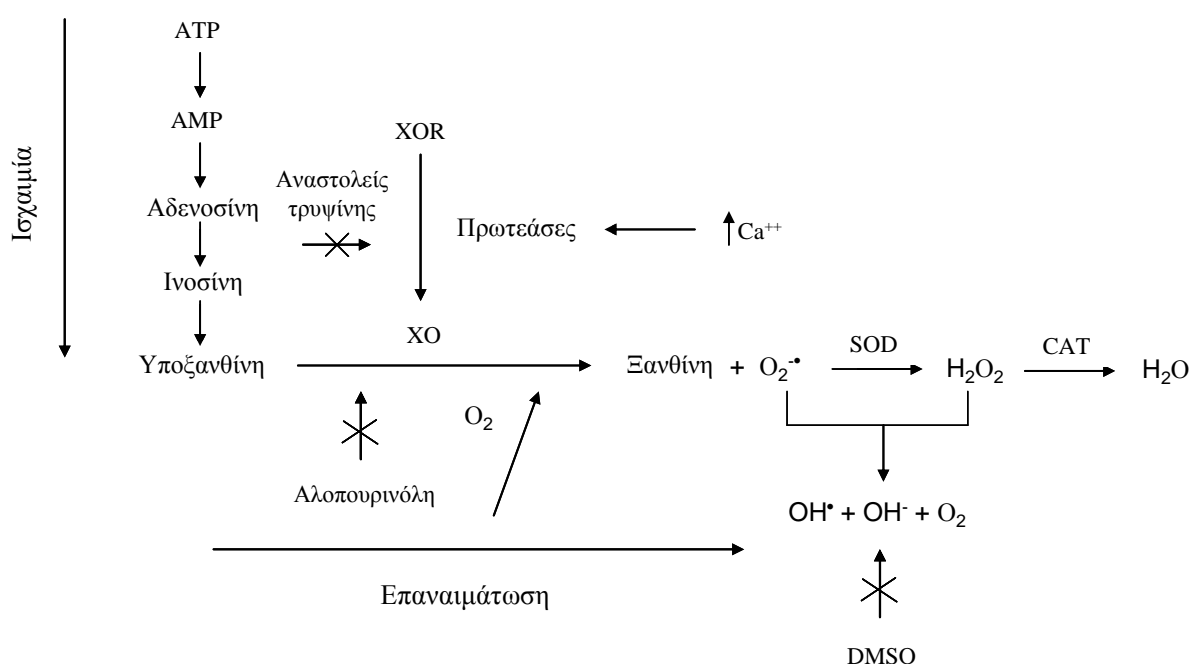
### **2.2.1. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων**

Από τις σημαντικότερες πηγές ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση θεωρείται η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν κύρια πηγή ελευθέρων ριζών γιατί σε αυτά βρίσκεται η αναπνευστική αλυσίδα των ενζύμων. Η μεταφορά ηλεκτρονίων δεν καταλήγει αποκλειστικά στο σχηματισμό  $H_2O$  αλλά όπως προαναφέρθηκε σε ηρεμία ένα ποσοστό από 0,4 έως 5% διαφεύγει από την αναπνευστική αλυσίδα. Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια αυτά ανάγουν το  $O_2$  και σχηματίζεται  $O_2^{\bullet-}$ , το οποίο ξεφεύγει από το σύμπλεγμα I (οξειδοαναγωγή της NADH-ουβικινόνης), που μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH στο συνένζυμο Q (ουβικινόνη) και το σύμπλεγμα II (οξειδοαναγωγή της ουβικινόλης του κυτόχρωματος c), που μεταφέρει ηλεκτρόνια από το συνένζυμο  $QH_2$  (ουβικινόλη) στο κυτόχρωμα c (Halliwell & Gutteridge, 2007; Slater, 1984). Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης η πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται 20 φορές, ενώ τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα αυξάνονται έως και 100 φορές (Ji, 1999). Έτσι, το ποσό των ηλεκτρονίων που διαφεύγει κατά αυτόν τον τρόπο είναι μεγαλύτερο απ' ό,τι σε κατάσταση ηρεμίας.

### **2.2.2. Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης**

Η υψηλής έντασης αναερόβια άσκηση προκαλεί το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion). Σε κατάσταση ισχαιμίας, η παροχή οξυγόνου στους ιστούς μειώνεται σημαντικά. Όταν αποκατασταθεί η κυκλοφορία, οι ιστοί αιματώνονται πάλι με αποτέλεσμα να αυξάνεται τόσο η παραγωγή ελευθέρων ριζών (και κυρίως  $O_2^{\bullet-}$ ) όσο και η οξειδωτική καταστροφή των ιστών από αυτές (McBride & Kraemer, 1999). Κατά το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης συμμετέχει το ένζυμο XO, που καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ κατά το μονοπάτι διάσπασης των πουρινών. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το ATP διασπάται σε ADP και AMP. Στα μυϊκά κύτταρα, το AMP διασπάται σε IMP, το IMP σε ινοσίνη, η ινοσίνη σε υποξανθίνη και η υποξανθίνη με τη βοήθεια του ενζύμου δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH) σε ξανθίνη, η οποία οξειδώνεται σε ουρικό οξύ. Στην ισχαιμία, το ATP αποικοδομείται σε AMP και ADP

λόγω των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων. Αν η παροχή οξυγόνου είναι ανεπαρκής τα επίπεδα του AMP αυξάνονται συνεχώς με αποτέλεσμα τη μετατροπή της XDH σε XO με τη μεσολάβηση μιας πρωτεάσης που ενεργοποιείται από τα αυξημένα επίπεδα των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και την αποικοδόμηση του AMP σε υποξανθίνη. Κατά τη φάση της επαναιμάτωσης, η υποξανθίνη παρουσία της XO οξειδώνεται σε ξανθίνη αντιδρώντας με το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται με αποτέλεσμα να σχηματίζονται  $\text{O}_2^{\bullet-}$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Εικόνα 7) (McCord & Fridovich, 1968).



**Εικόνα 7.** Ο μηχανισμός δράσης της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης (XOR) στο φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Granger et al., 1986).

Τα γεγονότα, που παρατηρούνται στην ισχαιμία-επαναιμάτωση συμβαίνουν κατά την αναερόβια άσκηση. Ωστόσο, υπάρχει η άποψη ότι συμβαίνουν και κατά την αερόβια όταν αυτή είναι εξαντλητική. Τα τελευταία δευτερόλεπτα πριν την εξάντληση ενεργοποιούνται αναερόβιοι μηχανισμοί όπως ο σχηματισμός XO και το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Σε προηγούμενες μελέτες, μάλιστα, η υπόθεση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται καθώς βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα ενδοκυττάριου ATP, αυξημένες συγκεντρώσεις υποξανθίνης στους μύες (Norman et al., 1987) και το αίμα (Hellsten-Westing et al., 1989) καθώς επίσης και ουρικού οξέος στο αίμα (Hellsten et al., 1988).

### 2.2.3. Η φλεγμονώδης αντίδραση

Η φλεγμονώδης αντίδραση ενεργοποιείται κατά την άσκηση και ειδικότερα όταν αυτή συνοδεύεται από μυϊκή καταστροφή (π.χ. έκκεντρη άσκηση). Τα πολυμορφοπύρηνα (polymorphonuclears, PMN) είναι η ομάδα κυττάρων, που συμμετέχει στη φλεγμονώδη αντίδραση με σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ιστών σε μολύνσεις από ιούς ή βακτήρια. Κατά την προκαλούμενη από την άσκηση μυϊκή καταστροφή τα PMN προσεγγίζουν την περιοχή της βλάβης και εκκρίνουν λυσοζύμη,  $O_2^{\bullet-}$  και άλλες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Η μεμβράνη των ουδετερόφιλων έχει ένζυμο όπως η οξειδάση του NADPH, η οποία καταλύει τη δημιουργία  $O_2^{\bullet-}$  και το σύστημα της λιποξυγενάσης, που οδηγεί στο σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (ROOH) ως ενδιάμεσων προϊόντων (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Το γεγονός ότι κατά την άσκηση, που προκαλεί μυϊκή καταστροφή εμφανίζεται φλεγμονή έχει επιβεβαιωθεί και με τον προσδιορισμό δεικτών φλεγμονής, όπως η IL-6 και η μυελοϋπεροξειδάση (Childs et al., 2001).

### 2.2.4. Οι κατεχολαμίνες

Η συγκέντρωση των κατεχολαμινών αυξάνεται κατά την άσκηση καθώς η δράση τους είναι συνυφασμένη με την αύξηση του οξειδωτικού μεταβολισμού των σκελετικών μυών και του μυοκαρδίου μέσω ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Απόρροια του γεγονότος αυτού είναι η αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Elosua et al., 2003).

### 2.2.5. Τα υπεροξειδιοσώματα

Είναι οργανίδια μέσα στα οποία συμβαίνει η μη μιτοχονδριακή οξείδωση των λιπαρών οξέων και των D-αμινοξέων. Αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για το μυοκάρδιο και τους σκελετικούς μύες κατά την άσκηση και μία σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Ji, 1999).

### 2.2.6. Η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης

Ελεύθερες ρίζες σε περιβάλλον άσκησης παράγονται από την οξειδωτική μετατροπή της αιμοσφαιρίνης ( $HbFe^{2+}$ ) σε μεθαιμοσφαιρίνη ( $metHbFe^{3+}$ ). Ο σίδηρος στο δακτύλιο της αίμης βρίσκεται στην αναγωγική κατάσταση ( $Fe^{2+}$ ) και παραμένει

στην κατάσταση αυτή και όταν συνδέεται με το  $O_2$ . Ωστόσο, ορισμένα ηλεκτρόνια του σιδήρου υφίστανται μετατόπιση προς το  $O_2$  με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας ενδιάμεσης μορφής ( $metHbFe^{3+}-O_2^{\bullet-}$ ). Με διάσπαση της μορφής αυτής ελευθερώνονται οι  $O_2^{\bullet-}$ . Η μετατροπή αυτή είναι μία φυσιολογική διαδικασία και εκτιμάται ότι το 3% της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων υφίσταται καθημερινά αυτή την οξείδωση. Το ποσοστό της  $metHbFe^{3+}$  αυξάνεται με την επίδραση της άσκησης και άλλων παραγόντων, όπως τα νιτρώδη ( $NO_2^-$ ). Η  $metHbFe^{3+}$  δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύει  $O_2$  κι έτσι είναι βιολογικά ανενεργή. Η μεθαιμοσφαιρίνη ανάγεται σε αιμοσφαιρίνη με το κυτόχρωμα b5 και την αναγωγή της μεθαιμοσφαιρίνης (Misra & Fridovich, 1972; Giakoustidis et al., 2001).

Η μυοσφαιρίνη μπορεί, επίσης, να αυτοοξειδωθεί ή να οξειδωθεί από ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης παράγοντας  $H_2O_2$ . Η μυοσφαιρίνη αντιδρά περαιτέρω με το  $H_2O_2$  και παράγει άλλες ρίζες (π.χ. ρίζες περοξυλίου) (Giulivi & Cadenas, 1998).

### **2.3. Άσκηση και οξειδωτικό στρες**

Είναι αποδεκτό ότι η άσκηση προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών (Davies et al., 1982). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι άμεσα εξαρτώμενη από την έντασή της. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση της άσκησης τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Palmer et al., 2003). Όταν η άσκηση είναι εξαντλητική τα επίπεδα ελευθέρων ριζών που παράγονται είναι πολύ υψηλά με αποτέλεσμα η αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών να μην μπορεί να τα εξουδετερώσει. Τότε εμφανίζεται το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί οξειδωτική καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων βιομορίων (Finaud et al., 2006). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πλήθος εργασιών, που έχουν μελετήσει την επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό στρες τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα.

#### **2.3.1. Η άσκηση συνοδεύεται από εμφάνιση οξειδωτικού στρες**

Σε πολλές εργασίες έχει βρεθεί ότι η αερόβια άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες όπως αυτό εκφράζεται από τη μεταβολή συγκεκριμένων δεικτών στο αίμα και το σκελετικό μυ του ανθρώπου. Έτσι, μετά από άσκηση μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο παρατηρήθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης και της



πρωτεϊνικής οξειδωσης και μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Η εμφάνιση οξειδωτικού στρες έχει παρατηρηθεί σε μελέτες με διαφορετικά είδη άσκησης συμπεριλαμβανομένων του τρεξίματος, της ποδηλασίας και της κολύμβησης (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Ashton et al., 1998; Child et al., 1998). Ακόμη, σε αθλητές του τριάθλου μετά από αγώνα αυξήθηκε η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Palazzetti et al., 2003), ενώ η δραστηριότητα της καταλάσης ήταν αυξημένη στο αίμα κολυμβητών των 800 μέτρων (Inal et al., 2001). Η άσκηση αύξησε και τη συγκέντρωση της GSSG (Aguilo et al., 2005) στο αίμα σε ποδηλάτες ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε στα ερυθροκύτταρα σε ποδηλάτες, που ασκήθηκαν στο 100% της  $VO_{2max}$  σε σύγκριση με αυτά των ποδηλατών, που ασκήθηκαν στο 40% της  $VO_{2max}$  (Lovlin et al., 1987). Επιπρόσθετα, άλλες μελέτες έδειξαν αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Kanter et al., 1993; Alessio et al., 1997; Laaksonen et al., 1999; Goto et al., 2003; Davison et al., 2007), της πρωτεϊνικής οξειδωσης (Sen et al., 1997; Orhan et al., 2004; Goldfarb et al., 2005; Bloomer et al., 2007a, 2007b) και της οξειδωσης της γλουταθειόνης στο αίμα, το σκελετικό μυ και τα ούρα μετά από αερόβια άσκηση (Gohil et al., 1988; Sastre et al., 1992; Sen et al., 1994; Laaksonen et al., 1999; Inayama et al., 2002; Bloomer et al., 2005; Goldfarb et al., 2005; Elokda et al., 2005; Tauler et al., 2006).

Η βιβλιογραφία περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ερευνών που ασχολούνται με τη μελέτη της επίδρασης της άσκησης στο οξειδωτικό στρες σε πειραματόζωα. Σε εργασίες που χρησιμοποίησαν το κολύμπι ως είδος άσκησης βρέθηκε οξειδωτικό στρες (Brady et al., 1979; Venditti & Di Meo, 1996) και ειδικότερα μείωση της συγκέντρωσης της GSH, αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG καθώς και μείωση της δραστηριότητας της SOD (Di Simplicio et al., 1997; Alessio et al., 2005). Επίσης, σε εργασίες που περιλαμβάνουν περπάτημα και τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο βρέθηκε οξειδωτικό στρες σε επίμυες (Jenkins et al., 1993; Radak et al., 1995, 1996; Faff & Frankiewicz-Jozko, 1997; Bejma & Ji, 1999; Li et al., 1999; Goldfarb et al., 2004; Oztasan et al., 2004) και σκύλους (Okamura et al., 1997). Στις περισσότερες εργασίες παρατηρήθηκε αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση (Rajguru et al., 1994), αυξημένη συγκέντρωση της MDA σε επίμυες (Ji et al., 1988), των TBARS σε ποντίκια (Semin et al., 2000) και της 8-υδροξυδεοξυγουανωσίνης (Radak et al., 2002) στο σκελετικό μυ (Reznick et al., 1992; You et al., 2005) και τους νεφρούς επιμύων (Semin et al.,

2000). Σε άλλες έρευνες σε επίμυες, η εξαντλητική άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ (Gomez-Cabrera et al., 2005; Stadtman & Levine, 2000), καθώς και τη λιπιδική υπεροξείδωση στο πλάσμα (Ajmani et al., 2003). Ακόμα, αύξηση στη λιπιδική υπεροξείδωση και στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων του πλάσματος και του γαστροκνήμιου μυός επιμύων παρατηρήθηκε και σε μία άλλη εργασία μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση (Alessio et al., 2000).

### *2.3.2. Εργασίες όπου η άσκηση δεν προκαλεί οξειδωτικό στρες*

Από την ανασκόπηση των ερευνών στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα που έγινε παραπάνω φαίνεται ότι η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Στην πραγματικότητα, το αποτέλεσμα αυτό εμφανίζεται στην πλειονότητα των εργασιών της βιβλιογραφίας. Ωστόσο, υπάρχουν και εργασίες, οι οποίες αναφέρουν ότι η άσκηση δε μεταβάλλει τους δείκτες οξειδωτικού στρες (Duthie et al., 1990; Witt et al., 1992; Inoue et al., 1993; Margaritis et al., 1997; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Vider et al., 2001; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009), ενώ υπάρχουν και άλλες στις οποίες αναφέρεται ακόμα και πτώση των δεικτών αυτών μετά την άσκηση σε σχέση με τις τιμές στην ηρεμία (Chevion et al., 2003; Inayama et al., 1996; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τα ευρήματα αυτά, οι οποίοι σχετίζονται με τα διαφορετικά πρωτόκολλα άσκησης που εφαρμόστηκαν αλλά και με το γεγονός ότι ορισμένα αντιοξειδωτικά, όταν εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, απομακρύνονται ή αδρανοποιούνται με αποτέλεσμα να μην εμφανίζεται αυξημένη η συγκέντρωσή τους μετά την άσκηση.

### *2.4. Επίδραση της άσκησης στο πρωτεϊνικό προφίλ*

Ο κλάδος της πρωτεωμικής αναφέρεται στη μελέτη του πρωτεώματος σε ευρεία κλίμακα με τη χρήση τεχνικών υψηλής απόδοσης. Ο όρος πρωτέωμα αναφέρεται στις πρωτεΐνες, που εκφράζονται από το γονιδίωμα (proteome, **protein complement of a genome**). Το πρωτέωμα δεν είναι ένα σταθερό χαρακτηριστικό των κυττάρων. Αντιθέτως, επειδή αντιπροσωπεύει τη λειτουργική έκφραση των πληροφοριών τροποποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Η πρωτεωμική ανάλυση εστιάζει στο χαρακτηρισμό και τη μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών ενός βιολογικού υλικού και έχει ως στόχο να αναγνωρίσει τόσο τις αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση όσο και τις

μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, τις αλληλεπιδράσεις τους, την κυτταρική και υπο-κυτταρική διανομή τους και τα χρονολογικά πρότυπα έκφρασης (Verrills, 2006). Συγκεκριμένα, η πρωτεωμική περιλαμβάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, την αναγνώρισή τους και το χαρακτηρισμό της φύσης και της θέσης των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE) και η φασματοσκοπία μάζας αποτελούν τις κύριες τεχνικές της πρωτεωμικής ανάλυσης. Η 2-DE χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού των πρωτεϊνών για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους με τη φασματοσκοπία μάζας. Τα μίγματα πρωτεϊνών διαχωρίζονται σε δύο διαστάσεις σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στην πρώτη διάσταση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και στη δεύτερη διάσταση με βάση το μοριακό τους βάρος. Έτσι, είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η απεικόνιση των πρωτεϊνών ενός δείγματος με μεγάλη ευκρίνεια.

#### *2.4.1. Εφαρμογές της πρωτεωμικής*

Η πρωτεωμική βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη των επιδράσεων διάφορων ασθενειών στους ιστούς με σκοπό την εύρεση θεραπευτικών παραγόντων. Το αναπτυσσόμενο πεδίο της κλινικής πρωτεωμικής αναγνωρίζει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογένεια ασθενειών και προσπαθεί να κατανοήσει πώς η έκφρασή τους, η δομή και η λειτουργία τους συμβάλλουν στην πρόκληση ασθενειών. Αυτή η τεχνολογία έχει αναγνωρίσει πρωτεΐνες, που είναι πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες ή θεραπευτικοί στόχοι σε διάφορες νόσους (Vivanco et al., 2008). Η πρωτεωμική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην έρευνα του καρκίνου για την αναγνώριση δεικτών με σκοπό τη διάγνωση, τον έλεγχο της εξέλιξης της ασθένειας και την αναγνώριση θεραπευτικών στόχων (Rodland, 2004) και σε ασθένειες όπως το άσθμα (Chung et al., 2004; Yeo et al., 2004; Roh et al., 2004), η νόσος του Alzheimer (Shin et al., 2004), οι δερματοπάθειες (Park et al., 2004), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Ali & Manolios, 2005) και η κυστική ίνωση (Sloane et al., 2005).

Όσον αφορά στο πρωτέωμα του σκελετικού μυός, σχετικά πρόσφατες έρευνες το έχουν περιγράψει με τεχνικές πρωτεωμικής (Yan et al., 2001; Capitanio et al., 2005; Gelfi et al., 2003, 2006a). Άλλες έχουν ασχοληθεί με τις μεταβολές του κατά την αναπτυξιακή διαδικασία (Doherty et al., 2004), τη γήρανση (Piec et al., 2005; Doran et al., 2007, 2008; O'Connell et al., 2007; Gelfi et al., 2006b), την παχυσαρκία (Hittel et al., 2005) και το διαβήτη τύπου II (Hojlund et al., 2003). Επιπλέον, οι μεταβολές στο πρωτέωμα του σκελετικού μυός εξετάστηκαν και ως απόκριση σε

παρεμβάσεις όπως η απονεύρωση (Isfort et al., 2000), η ατροφία και η υπερτροφία (Isfort et al., 2002), η χρόνια διέγερση σε χαμηλές συχνότητες (Donoghue et al., 2005, 2007) και διάφοροι φαρμακολογικοί παράγοντες (Burniston et al., 2007).

#### *2.4.2. Μελέτη της πρωτεωμικής έκφρασης κατά την άσκηση*

Η εφαρμογή της 2-DE πρωτεϊνών στην έρευνα γύρω από το πεδίο της άσκησης βρίσκεται ακόμα σε πρωτόλειο στάδιο (Hittel et al., 2007; Burniston, 2008). Σε μία εργασία που έγινε πρωτεωμική ανάλυση στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων 30 min μετά από κολύμπι βρέθηκε διαφορά στην έκφραση 3 γονιδίων και ανιχνεύθηκαν 61 κηλίδες στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης. Η κρεατινική κινάση μειώθηκε αμέσως μετά και επέστρεψε στα επίπεδα της ηρεμίας μετά από 30 min ενώ η αντίθετη συμπεριφορά παρατηρήθηκε για την Hsp20 και την αδενυλική κυκλάση 1 (Guelfi et al., 2006). Εξάλλου, μία έρευνα στον καρδιακό μυ επιμύων έδειξε αύξηση στην Hsp20 μετά από τρέξιμο υψηλής έντασης για 6 βδομάδες (Boluyt et al., 2006). Ακόμη, με τις τεχνικές της πρωτεωμικής έγινε ανάλυση του πρωτεώματος του πυρήνα, του κυτταροσκελετού και του κυτταροπλάσματος στο γαστροκνήμιο και τον υποκνημίδιο μυ ποντικών (Vitorino et al., 2007). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται κάποιες ακόμα εργασίες, στις οποίες έγινε πρωτεϊνικός χαρακτηρισμός σε σκελετικούς μύες βραδείας και ταχείας συστολής (Cai et al., 2000; Cieniewski-Bernard et al., 2004; Le Bihan et al., 2004; Jarrold et al., 2005). Παρόμοια ανάλυση έγινε και σε μία ακόμα εργασία, όπου μελετήθηκε το πρωτεϊνικό προφίλ ενός σκελετικού μυός βραδείας συστολής (του υποκνημίδιου μυός) και ενός ταχείας συστολής (του μακρού εκτείνοντος τους δακτύλους μυός). Βρέθηκαν διαφορές κυρίως σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μεταβολικές διεργασίες, καθώς οι δύο αυτοί μύες χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές ενέργειας κατά τη διάρκεια της άσκησης (Okumura et al., 2005).

#### *2.5. Χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων πριν την άσκηση*

Στη βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος εργασιών, οι οποίες ασχολούνται με τη χορήγηση εκχυλισμάτων από διάφορα είδη φυτών πριν την άσκηση. Οι εργασίες αυτές έχουν γίνει τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα (επίμυες και ποντίκια). Στην πλειοψηφία τους μελετούν τις επιδράσεις της χρόνιας κι όχι της οξείας χορήγησης εκχυλισμάτων πριν την άσκηση στο οξειδωτικό στρες και το μεταβολισμό σε διάφορους ιστούς. Στις περισσότερες εργασίες τα εκχυλίσματα

έδρασαν προστατευτικά απέναντι στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες, ενώ κάποια βελτίωσαν και την απόδοση. Ωστόσο, υπήρξαν και εργασίες, στις οποίες τα εκχυλίσματα προκάλεσαν οξειδωτικό στρες, ενώ δεν επηρέασαν την απόδοση.

Τα εκχυλίσματα από το φυτό *Panax ginseng*, το οποίο φυτρώνει κυρίως στην Κίνα και την Κορέα, είναι από τα πιο καλά μελετημένα. Μετά από χορήγησή του για σε επίμνες (για 8 εβδομάδες σε δόσεις των 2 g τρεις φορές τη μέρα) πριν από εξαντλητική άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της MDA, αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης και της SOD στο αίμα 10 και 30 min μετά την άσκηση καθώς και αύξηση της απόδοσης (Kim et al., 2005). Επίσης, μετά από χορήγηση εκχυλίσματος *Panax ginseng* από το στόμα για 3 μήνες σε διάφορες δόσεις, οι επίμνες έκαναν άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο και τα αποτελέσματα έδειξαν δοσοεξαρτώμενη μείωση της συγκέντρωσης των TBARS, αύξηση της δραστηριότητας της SOD και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ηπατικό επίπεδο (Voces et al., 1999). Ανάλογα αποτελέσματα είχε και η χορήγηση από το στόμα εκχυλίσματος *Panax Ginseng* σε επίμνες για 3 μήνες σε δόσεις 3, 10, 100 και 500 mg/kg σωματικού βάρους πριν την άσκηση, καθώς μείωσε τη συγκέντρωση της MDA και τη δραστηριότητα της κιτρικής συνθάσης στον υποκνημίδιο μυ και τον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους (Voces et al., 2004). Ωστόσο, δε βρέθηκε καμία επίδραση στη δραστηριότητα της γαλακτικής δεϋδρογονάσης μετά από χορήγηση εκχυλίσματος του ίδιου φυτού σε επίμνες σε δοσολογία 50 mg/kg σωματικού βάρους και παράλληλη άσκηση για 12 εβδομάδες (Ferrando et al., 1999).

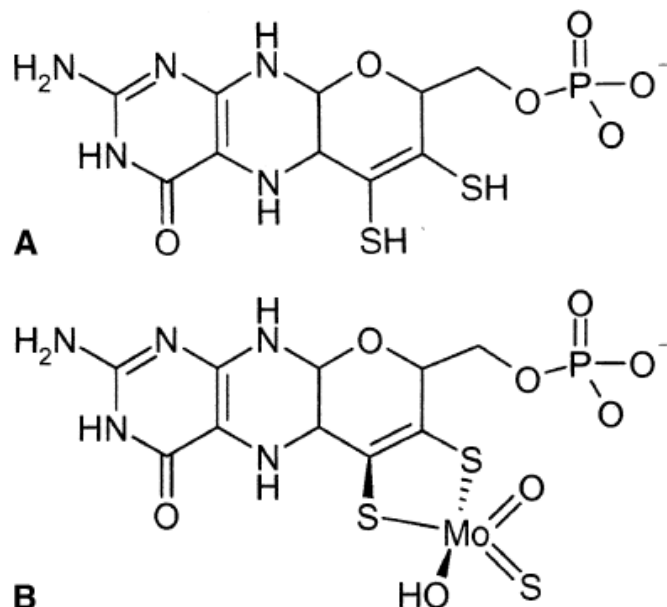
Ακόμη, σε μελέτη που έγινε σε ομάδα κωπηλατών χορηγήθηκε εκχύλισμα από το φυτό *Rhodiola rosea*, που φύεται στις ψυχρές περιοχές της Γης, όπως είναι η Αρκτική, τα βουνά της κεντρικής Ασίας, οι Άλπεις και οι χώρες της Σκανδιναβίας. Η συχνότητα χορήγησης ήταν 2 φορές την ημέρα σε δόσεις των 100 mg για 4 εβδομάδες με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί αυξημένη TAC στο πλάσμα αλλά μειώθηκε η δραστηριότητα της SOD στα ερυθροκύτταρα έως και 24 h μετά την άσκηση καταδεικνύοντας οξειδωτική δράση του εκχυλίσματος (Skarpanska-Stejnborn et al., 2009). Παρομοίως, η TAC αυξήθηκε, αλλά η οξειδωτική καταστροφή των ερυθροκυττάρων, που είχε προκληθεί λόγω της προπόνησης σε κωπηλάτες δεν περιορίστηκε μετά από χορήγηση εκχυλίσματος *Cynara scolymus L.* (αγγινάρας) 3 φορές την ημέρα για 5 εβδομάδες σε δόσεις των 400mg (Skarpanska-Stejnborn et al.,

2008). Μείωση στη δραστικότητα της SOD, αλλά αύξηση της αντοχής, παρατηρήθηκε και λόγω της στοματικής χορήγησης σε επίμυες εκχυλίσματος σκόρδου σε δόση 2,86 g/kg σωματικού βάρους 30 min πριν από άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο, που γινόταν για 5 μέρες την εβδομάδα επί 4 βδομάδες (Moriyama et al., 2006). Αυξημένη αντοχή παρατηρήθηκε και μετά από χορήγηση εκχυλίσματος από το φυτό *Eucommia ulmoides*, ένα μικρό δέντρο στην Κίνα που καλλιεργείται ιδιαίτερα για τους φλοιούς του που έχουν ιδιαίτερη αξία στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική. Η χορήγηση έγινε σε επίμυες και την 29η μέρα υποβλήθηκαν σε άσκηση αντοχής σε δαπεδοεργόμετρο με κλίση 7° και 24 h μετά έγινε η δειγματοληψία ήπατος (Li et al., 1999). Αυξημένη απόδοση, όπως φάνηκε από τον αυξημένο χρόνο κολύμβησης με 5% επιπρόσθετο βάρος καθώς και αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου στο ήπαρ είχε ως αποτέλεσμα η χορήγηση εκχυλίσματος του φυτού *Rhodiola rosea* για 2-4 εβδομάδες σε επίμυες (Lee et al., 2009). Σε άλλη μελέτη χορηγήθηκε εκχύλισμα του φυτού *Prunus mume*, γνωστού και ως ιαπωνικό βερίκοκο, σε επίμυες σε συγκεντρώσεις 1,5%, 0,9% και 0,3% για 4 εβδομάδες και τα δείγματα μυός και ήπατος λήφθηκαν αμέσως και 30min μετά την άσκηση. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε αύξηση των ηπατικών και μυϊκών συγκεντρώσεων γλυκογόνου στα ζώα, που θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση (Kim et al., 2008). Ακόμη, αντιοξειδωτική δράση παρατηρήθηκε και μετά από στοματική χορήγηση εκχυλίσματος πολυσακχαριτών από το *Euphorbia kansui*, που χρησιμοποιείται ως παραδοσιακό φάρμακο στην Κίνα, σε επίμυες, που υποβλήθηκαν σε εξαντλητική κολύμβηση καθώς μειώθηκε η συγκέντρωση της MDA, αυξήθηκε η δραστικότητα της SOD σε σκελετικό μυ και περιορίστηκε η κόπωση (Yu et al., 2006). Η συγκέντρωση της MDA μειώθηκε στον πρόσθιο κνημιαίο μυ, τον εγκέφαλο και το ήπαρ επιμύων και μετά από χορήγηση εκχυλίσματος του φυτού *Pterodon emarginatus* της νότιας Βραζιλίας, σε δοσολογία 498 mg/kg σωματικού βάρους πριν και μετά από οξεία άσκηση (Paula et al., 2005), όπως και μετά από χορήγηση πολυσακχαριτών από το *Lycium Barbarum*, ένα φυτό της νοτιοανατολικής Ευρώπης και της Ασίας γνωστό και ως κινέζικο μούρο, σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε πρόγραμμα άσκησης 30 ημερών. Τα αποτελέσματα έδειξαν, επιπλέον, μειωμένη δραστικότητα της κρεατινικής κινάσης στο αίμα και αυξημένα επίπεδα μυϊκού γλυκογόνου (Niu et al., 2008). Τέλος, μετά από χορήγηση εκχυλίσματος από μαύρη σταφίδα στον άνθρωπο αλλά και σε κυτταρικά μοντέλα πριν την άσκηση βρέθηκε

μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και μείωση της προκαλούμενης από την άσκηση φλεγμονής (Lyll et al., 2009).

### **3. Οξειδοαναγωγή της ξανθίνης**

Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR) απαντάται σε δύο μορφές, την οξειδάση της ξανθίνης (XO) και τη δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH). Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υδροξυλασών μολυβδαινίου (Bray, 1975). Το ένζυμο συντίθεται ως δεϋδρογονάση στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, αλλά μπορεί να μετατραπεί σε οξειδάση είτε αντιστρεπτά μέσω οξείδωσης των σουλφυδρικών καταλοίπων είτε μη αντιστρεπτά μέσω πρωτεόλυσης (Harrison, 2002). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου και στις δύο μορφές έχει προσδιοριστεί και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός της μετατροπής του βασίζεται στη δομή του (Enroth et al., 2000; Godber et al., 2005). Το ένζυμο είναι ένα ομοδιμερές μοριακού βάρους 290 kDa με κάθε μονομέρες να δρα μεμονωμένα στην κατάλυση. Κάθε ένζυμο αποτελείται από δύο υπομονάδες των 145 kDa και, παρά το ότι κάθε υπομονάδα έχει ένα ενεργό κέντρο, απαιτείται ο σχηματισμός διμερούς για να δράσουν. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 3 περιοχές: Ένα αμινοτελικό άκρο 20 kDa, που έχει το σύμπλεγμα  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ , μία κεντρική περιοχή 40 kDa, η οποία περιέχει ένα μόριο FAD και ένα καρβοξυτελικό άκρο 85 kDa στο οποίο υπάρχουν 4 οξειδοαναγωγικά κέντρα και είναι προσδεδεμένος ο συμπαράγοντας, που αποτελείται από την περίνη ενωμένη με ένα άτομο  $\text{Mo}^{6+}$  σχηματίζοντας τη μολυβδοπερίνη (Εικόνα 8) (Felsted et al., 1973; Harrison, 2002; Pacher et al., 2006).



**Εικόνα 8.** (Α) Πτερίνη, (Β) ο συμπάράγοντας μολυβδενίου, ο οποίος αποτελείται από ένα άτομο  $\text{Mo}$  συνδεόμενο στην πτερίνη με δύο άτομα  $\text{S}$ . Στην ανενεργή μορφή του ενζύμου τα άτομα  $\text{S}$  αντικαθίστανται από δύο άτομα  $\text{O}$ .

Ο μηχανισμός δράσης των υδροξυλασών μολυβδαινίου έχει μελετηθεί λεπτομερέστερα με την  $\text{XO}$ . Το υπόστρωμα αλληλεπιδρά με το κέντρο του μολυβδαινίου και μεταφέρονται δύο ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα προς το  $\text{Mo}^{6+}$ , το οποίο ανάγουν σε  $\text{Mo}^{4+}$ . Κατόπιν, το μόριο που δρα ως υπόστρωμα μεταφέρεται μέσω ενός διαμοριακού μεταφορέα ηλεκτρονίων στο φλαβινικό κέντρο, όπου αντιδρά με  $\text{O}_2$  και παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η υδρόλυση του συμπλόκου μολυβδαίνιο-υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο ηλεκτρονίων. Αυτά διανέμονται στα οξειδοαναγωγικά κέντρα του ενζύμου, δηλαδή στο σύμπλοκο  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ . Το μολυβδαίνιο οξειδώνεται ξανά μέσω ενδοκυτταρικής μεταφοράς ηλεκτρονίων (Spence et al., 1982). Παρατηρούνται δηλαδή δύο ξεχωριστές υποαντιδράσεις. Η πρώτη είναι η οξείδωση του δότη των ηλεκτρονίων με ταυτόχρονη αναγωγή του ενζύμου και η άλλη είναι η επανοξείδωση του ενζύμου με τη βοήθεια ενός δέκτη ηλεκτρονίων.

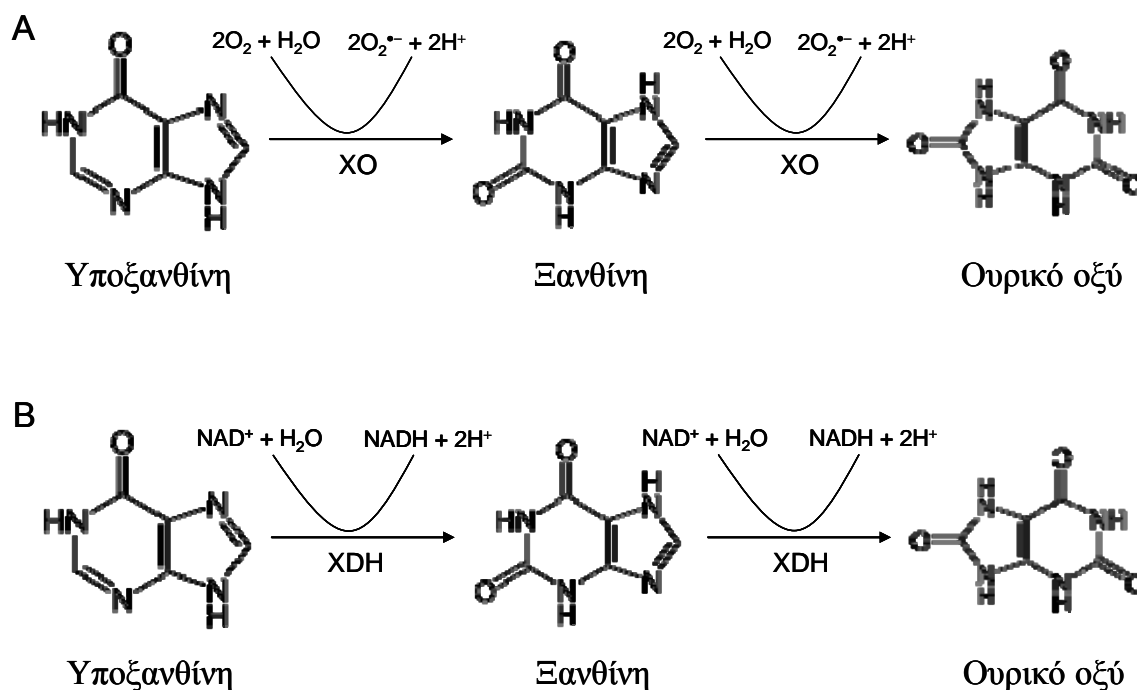
Η  $\text{XOR}$  είναι παρούσα σε υψηλά επίπεδα στο μαστικό γαλακτοπαραγωγό αδέν (Sasaki et al., 1983), το λεπτό έντερο και το ήπαρ (Badway et al., 1981). Έχει, επίσης, ανιχνευθεί στο σκελετικό μυ, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, την επιδερμίδα και την καρδιά (Sasaki et al., 1983). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ύπαρξης της  $\text{XOR}$  στα τριχοειδή του εγκεφάλου (Betz, 1985) όπως και στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μακροφάγα του ποντικού και μάλιστα έχει παρατηρηθεί αύξηση



στα επίπεδά της σε περιπτώσεις βακτηριακής μόλυνσης (Tubaro et al., 1980). Η XOR υπάρχει τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια. Οι υδροξυλάσες μολυβδαινίου είναι διασπαρμένες στο ζωικό βασίλειο. Υψηλά επίπεδα XOR βρέθηκαν στους επίμυες και το σκύλο ενώ η δράση της είναι ασθενέστερη στα ασπόνδυλα σε σχέση με τα σπονδυλωτά. Η XOR έχει ανιχνευθεί, επίσης, στα βακτήρια (Woolfolk et al., 1977) και τα κοιλεντερωτά (Krenitsky et al., 1974).

Η XO συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις όπως η οξείδωση των πουρινών, των πτερινών και των αλειφατικών και αρωματικών αλδευδών (Panoutsopoulos & Beedham, 2004; Veskoukis et al., 2006). Μία από τις κύριες λειτουργίες, στις οποίες συμμετέχει η XO είναι η κατάλυση της οξείδωσης της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Εικόνα 9). Επίσης, η XO είναι το κύριο ένζυμο παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2005). Έχει βρεθεί ότι η XO ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μεταμεταγραφικό επίπεδο (Ghio et al., 2002) καθώς για την ενεργοποίησή της κατά την υποξία πρέπει να φωσφορυλιωθεί από την p38 MAP κινάση (Kayyali et al., 1998).

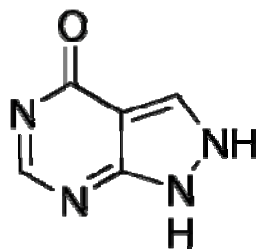
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 9, η δράση της XO οδηγεί τόσο στην παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$  όσο και στην αύξηση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος. Το ουρικό οξύ είναι το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο του πλάσματος και μπορεί να εξουδετερώνει τη δράση του  $O_2^{\bullet-}$  και ορισμένων RNS (Kooy et al., 1994). Επίσης, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η προστατευτική δράση του ουρικού οξέος απέναντι σε ασθένειες όπως η εγκεφαλομυελίτιδα, μία μορφή πολλαπλής σκλήρωσης (Hooper et al., 1998) ενώ δρα και ως χηλικός δεσμευτής του σιδήρου στα εξωκυτταρικά υγρά (Ghio et al., 2002).



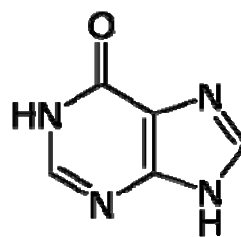
**Εικόνα 9.** Οι αντιδράσεις που καταλύουν η XO (A) και η XDH (B).

#### 4. Αλοπουρινόλη

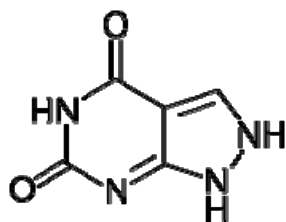
Η αλοπουρινόλη [4-υδροξυπυράζολο (3,4-d) πυριμιδίνη] συντέθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1950 από την εταιρεία Falco στην προσπάθεια παρασκευής αντινεοπλαστικών παραγόντων (Pacher et al., 2006). Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι είχε ανασταλτική δράση στην XO μειώνοντας τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος τόσο στα ούρα όσο και τον ορό του αίματος (Elion, 1988). Έτσι, εγκρίθηκε το 1966 για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας και της υπερουριχαιμίας (Rott & Agudelo, 2003; Wortmann, 2005). Η αλοπουρινόλη είναι δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και μεταβολίζεται αμέσως σε οξυπουρινόλη, η οποία είναι δομικό ανάλογο της ξανθίνης (Εικόνα 10).



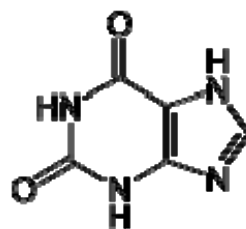
Αλοπουρινόλη



Υποξανθίνη



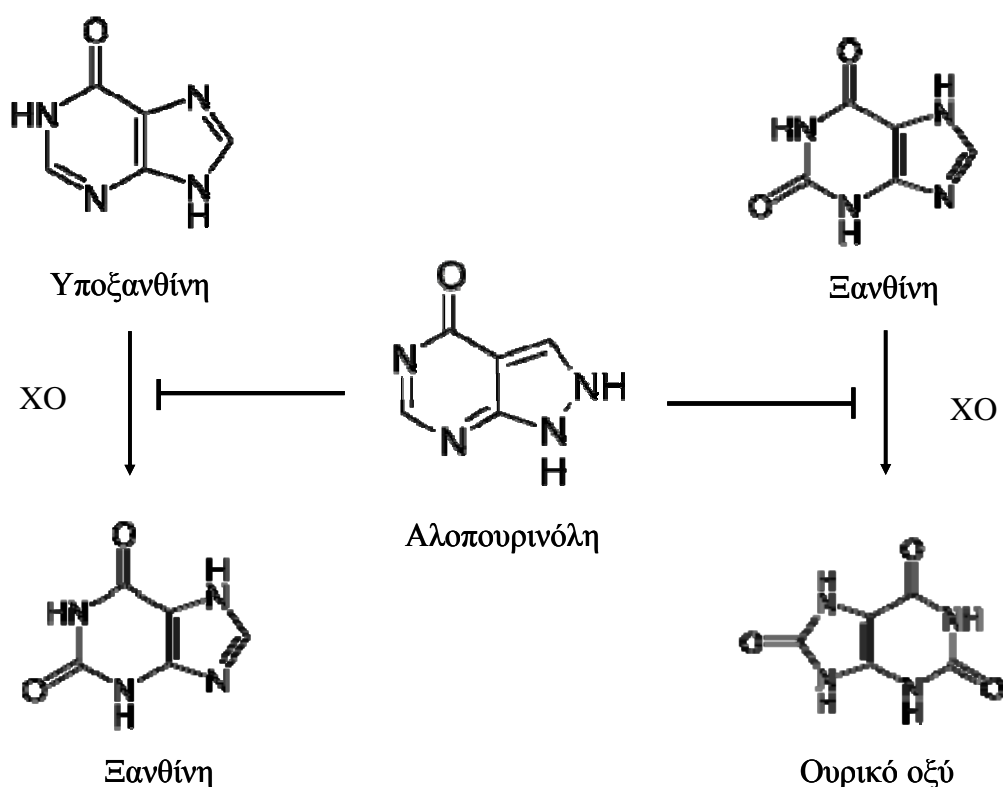
Οξυπουρινόλη



Ξανθίνη

**Εικόνα 10.** Η αλοπουρινόλη και η οξυπουρινόλη ως δομικά ανάλογα της υποξανθίνης και της ξανθίνης, αντίστοιχα.

Αναστέλλει τη δραστηριότητα της XO και συγκεκριμένα είναι υπόστρωμα και συναγωνιστικός αναστολέας της. Η οξυπουρινόλη είναι μη συναγωνιστικός αναστολέας της XO και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημζωής (14-30 h) από την αλοπουρινόλη (2-3 h) (Pea, 2005). Η φαρμακολογική δράση της αλοπουρινόλης οφείλεται, έτσι, σε μεγάλο βαθμό σε αυτό το μεταβολίτη της. Τόσο η αλοπουρινόλη όσο και η οξυπουρινόλη ασκούν την ανασταλτική τους δράση στο ένζυμο δρώντας στο κέντρο μολυβδαινίου (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11.** Οι αντιδράσεις που αναστέλλει η αλοπουρινόλη.

Μέσω αναστολής της παραγωγής του ουρικού οξέος στο πλάσμα εμποδίζεται η συσσώρευσή του με τη μορφή κρυστάλλων στις αρθρώσεις και η εμφάνιση χρόνιας ουρικής αρθρίτιδας (Rott & Agudelo, 2003; 2004; Pea, 2005). Οι κρύσταλλοι ουρικού οξέος εξαφανίζονται βαθμιαία και αποφεύγεται η πρόκληση νεφροπάθειας. Εκτός από την ουρική αρθρίτιδα και την υπερουριχαιμία, η αλοπουρινόλη βρίσκει εφαρμογές στην αντιμετώπιση και άλλων παθολογικών καταστάσεων. Έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματική απέναντι σε καταστάσεις ισχαιμίας στο σκύλο, τη γάτα και τον επίμυ (Boros et al., 1991; Parks & Granger, 1983; Yildirim et al., 2002) και στη χρόνια καρδιοπάθεια (Struthers et al., 2002; Doehner et al., 2002). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και παρενέργειες που εμφανίζονται ακόμα και μετά από χρόνια χορήγηση αλοπουρινόλης με συχνότερες τον ερεθισμό της επιδερμίδας και του εντέρου, τη φλεγμονή και τη δυσλειτουργία των νεφρών (Rott & Agudelo, 2003; Terkeltaub, 2003; Bieber & Terkeltaub, 2004).

#### *4.1. Ο ρόλος της αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση κατά την άσκηση*

Ο πολύ σημαντικός και διττός ρόλος της XO στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος κατά την άσκηση φάνηκε για πρώτη φορά από τους Hellsten et al., (1988). Κατόπιν, για την καλύτερη μελέτη της δράσης του ενζύμου κατά την άσκηση σχεδιάστηκαν πειράματα από διάφορες ερευνητικές ομάδες, στα οποία η δραστηριότητά της ανεστάλη μέσω χορήγηση αλοπουρινόλης. Ο αριθμός των σχετικών εργασιών δεν είναι μεγάλος και αναφέρουν στο σύνολό τους ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης είχε προστατευτική δράση απέναντι στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, μετά από χορήγηση μίας δόσης 32 mg/kg σωματικού βάρους αλοπουρινόλης ενδοπεριτοναϊκά σε επίμυες πριν από τρέξιμο μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο βρέθηκε μείωση της συγκέντρωσης της GSSG και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που είχε αυξηθεί μετά την άσκηση στο σκελετικό μυ (Gomez-Cabrera et al., 2005). Σε άλλη εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας, μετά από στοματική χορήγηση αλοπουρινόλης σε ημερήσιες δόσεις των 300 mg για 3 βδομάδες πριν από αγώνα ποδηλασίας βρέθηκε ότι η αύξηση της MDA στο πλάσμα λόγω της άσκησης μετριάστηκε από την αλοπουρινόλη, όπως μετριάστηκε και η μυϊκή καταστροφή εκφρασμένη από τους δείκτες κρεατινική κινάση και αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος (Gomez-Cabrera et al., 2003). Η προκαλούμενη από την άσκηση αύξηση της συγκέντρωσης της MDA στο πλάσμα μετριάστηκε και μετά από στοματική χορήγηση αλοπουρινόλης σε δόση των 300 mg σε αθλητές 2 h πριν από μααραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006). Ο αντιοξειδωτικός ρόλος της αλοπουρινόλης επιβεβαιώθηκε και σε ακόμα μία εργασία καθώς η ενδοπεριτοναϊκή χορήγησή της σε επίμυες σε δόση 44 mg/kg σωματικού βάρους δεν επέτρεψε να αυξηθεί η συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ 3 h μετά από τρέξιμο μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο (Koyama et al., 1999). Προς την ίδια κατεύθυνση ήταν και τα αποτελέσματα μίας εργασίας, στην οποία χορηγήθηκε αλοπουρινόλη από το στόμα σε δόση 30 mg/kg σωματικού βάρους και ενδοπεριτοναϊκά σε δόση 5 mg/kg σωματικού βάρους σε άλογα, 12 και 2 h πριν την εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλου (Mills et al., 1997). Βρέθηκε ότι η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων στο πλάσμα και της GSSG στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ενώ η αλοπουρινόλη ανέστειλε τις αυξήσεις αυτές δρώντας αντιοξειδωτικά. Η υπόθεση ότι η αλοπουρινόλη αναστέλλει τις οξειδωτικές επιδράσεις της άσκησης εξετάστηκε και σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική

πνευμονοπάθεια (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε άσκηση σε κυκλοεργόμετρο μέχρι εξάντλησης (Heunks et al., 1999). Ανάλογη ήταν η δράση της αλοπουρινόλης σε ασθενείς με COPD και σε μία άλλη εργασία, όπου απέτρεψε την προκαλούμενη από την άσκηση αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG και της MDA στο πλάσμα των ασθενών (Vina et al., 2000). Η άσκηση αύξησε το λόγο GSSG/GSH και τη συγκέντρωση της MDA στο αίμα, ενώ η αλοπουρινόλη απέτρεψε τη μεταβολή των δεικτών αυτών μετά την άσκηση. Η αλοπουρινόλη είχε, επίσης, αντιοξειδωτική δράση όταν χορηγήθηκε σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε τρέξιμο, καθώς ανέστειλε την προκαλούμενη από την άσκηση μείωση της συγκέντρωσης της GSH (Duarte et al., 1993). Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η αλοπουρινόλη είχε αντιοξειδωτικό ρόλο στις λίγες σχετικές εργασίες της βιβλιογραφίας, καθώς μετρίασε την οξειδωτική δράση της άσκησης σε πειράματα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα. Σε ορισμένες από τις προαναφερθείσες εργασίες και σε κάποιες ακόμα εξετάστηκε και η επίδραση της χορήγησης της αλοπουρινόλης στην απόδοση τόσο των ανθρώπων όσο και των πειραματόζωων, που χρησιμοποιήθηκαν (Gomez-Cabrera et al., 2003, 2005, 2006; Koyama et al., 1999; Gavin & Struthers, 2005; Sutton et al., 1980). Ωστόσο, σε καμία από αυτές δε βρέθηκε επίδραση, όπως μετρήθηκε από το χρόνο που απαιτείται για να επέρθει η εξάντληση. Υπάρχει, τέλος και μία εργασία που παρατήρησε βελτίωση της απόδοσης *in vitro* στον υποκνημίδιο μυ μετά από χορήγηση αλοπουρινόλης (Barclay & Hansel, 1991).

## 5. Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, ενώ έχει αποδειχθεί ότι συντίθεται και σε σκελετικούς μύες επίμυων (Yamada et al., 1984). Εξάγεται από το ήπαρ σε μη γλυκοζυλιωμένη μορφή και φτάνει στο πλάσμα σε συγκέντρωση 35-50 g/L. Η ανθρώπινη αλβουμίνη αποτελεί περίπου το 60% των πρωτεϊνών του πλάσματος. Είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 66 kDa, αποτελείται από 585 αμινοξέα και χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 4. Το μόριο της αλβουμίνης αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές. Η καθεμία αποτελείται από δύο ξεχωριστές ελικοειδείς υποπεριοχές (Α και Β). Στην υποπεριοχή ΙΑ προσδένονται ογκώδη ετεροκυκλικά ανιόντα, ενώ στην υποπεριοχή ΙΙΑ προσδένονται αρωματικά καρβοξύλια (Halliwell & Gutteridge, 2007). Ο χρόνος ημιζωής της αλβουμίνης είναι περίπου 20 μέρες (Bourdon et al., 1999) αλλά

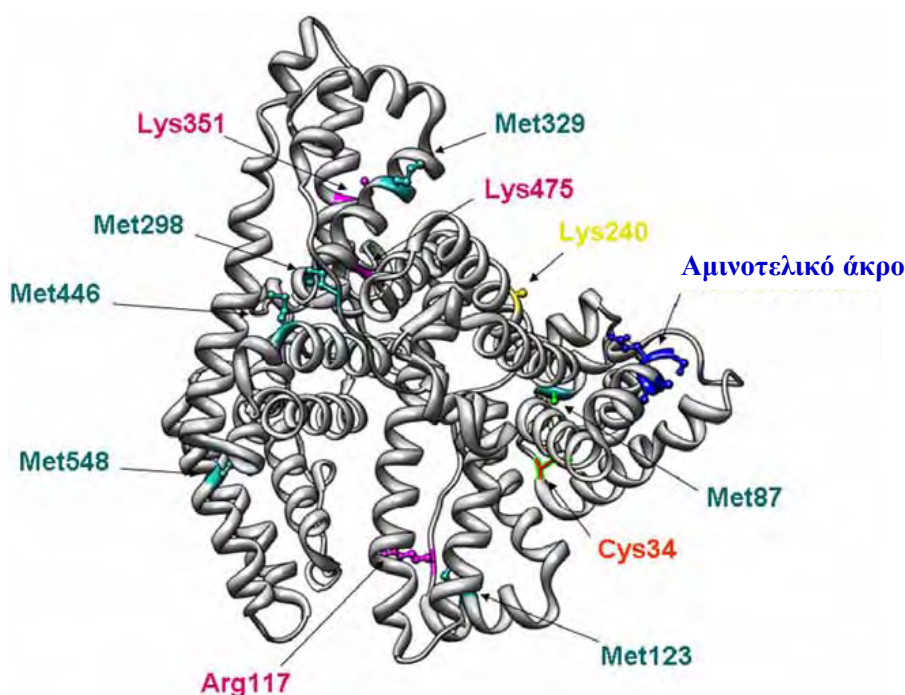
ασθένειες ή οξειδωτική βλάβη μπορούν να μειώσουν το χρόνο αυτό. Στο μόριο της αλβουμίνης προσδένονται, επίσης, ενδογενή και εξωγενή συστατικά, όπως λιπαρά οξέα, μεταλλικά ιόντα, φάρμακα και χοληστερόλη (Roche et al., 2008). Οι κύριες λειτουργίες της αλβουμίνης είναι η διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης, η μεταφορά διαφόρων μορίων και η προσωρινή αποθήκευση αμινοξέων (Ellmerer et al., 2000). Έχει θέσεις δέσμευσης για διάφορα συστατικά, όπως ορμόνες, μεταλλικά ιόντα και ξеноβιοτικά. Ακόμα, φάρμακα και μεταβολίτες προσδένονται με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η κατανομή τους στους ιστούς και συνεπώς η αποτελεσματικότητά τους. Επίσης, δρα ως ένζυμο έχοντας δράση ενολάσης και εστεράσης (Drmanovic et al., 1999; Masson et al., 2007). Η αλβουμίνη έχει και αντιοξειδωτική δράση, καθώς προστατεύει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες (Quinlan et al., 1994).

### *5.1. Ο αντιοξειδωτικός ρόλος της αλβουμίνης*

Η αλβουμίνη του ορού του αίματος περιέχει ένα ανηγμένο κατάλοιπο κυστεΐνης (Cys34) (Εικόνα 12), το οποίο είναι η μεγαλύτερη πηγή θειολών στην κυκλοφορία αφού η συγκέντρωση της αλβουμίνης εκεί είναι πολύ υψηλή (Oetl & Stauber, 2007). Σε υγιείς ενήλικες το 70-80% των καταλοίπων Cys34 στην αλβουμίνη έχει ελεύθερη τη σουλφυδρυλική ομάδα, ενώ τα υπόλοιπα σχηματίζουν δισουλφίδια με διάφορα μόρια όπως κυστεΐνη, ομοκυστεΐνη ή γλουταθειόνη (Oetl & Stauber, 2007). Η μορφή αυτή της αλβουμίνης είναι η μερκαπταλβουμίνη (HMA). Η αλβουμίνη πιστεύεται ότι δεσμεύει υδροξύλια ή άλλες ελεύθερες ρίζες μέσω του καταλοίπου Cys-34 (Gutteridge, 1986). Σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες το μόριο της αλβουμίνης οξειδώνεται αντιστρεπτά και η Cys-34 οδηγεί στο σχηματισμό σουλφενικού οξέος (RSOH), που οξειδώνεται περαιτέρω προς σουλφινικό οξύ ( $\text{RSO}_2\text{H}$ ) και σουλφονικό οξύ ( $\text{RSO}_3\text{H}$ ) (Carballal et al., 2006). Η πρώτη μορφή της αλβουμίνης είναι η μη-μερκαπταλβουμίνη 1 (HNA1) και η δεύτερη η μη-μερκαπταλβουμίνη 2 (HNA2) (Lamprecht et al., 2009). Το σουλφενικό οξύ είναι ένα σύνθετο ενδιάμεσο προϊόν της αντιστρεπτής και μη αντιστρεπτής τροποποίησης διαφόρων μορίων από τις ελεύθερες ρίζες. Έχει εμπλακεί στο σχηματισμό δισουλφιδίων στο μόριο της αλβουμίνης με αποτέλεσμα να συμμετέχει η ίδια στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας εξωκυτταρικά (Carballal et al., 2006).

Τα 6 κατάλοιπα της μεθειονίνης του μορίου της αλβουμίνης είναι, όπως και τα κατάλοιπα της κυστεΐνης, ευαίσθητα στην οξείδωση (Bourdon & Blache, 2001;

Bourdon et al., 2005). Η μεθειονίνη είναι ευπαθής στην οξείδωση και τα οξειδωτικά οδηγούν στην παραγωγή σουλφοξειδίου μεθειονίνης (Berlett & Stadtman, 1997). Η περαιτέρω οξείδωση σε σουλφόνιο δε συμβαίνει φυσιολογικά στα βιολογικά συστήματα, αλλά μόνο μετά από συγκεκριμένες παρεμβάσεις. Το σουλφοξείδιο της μεθειονίνης μπορεί να μετατραπεί ξανά σε μεθειονίνη με ήπια αναγωγικά μέσα ή με τη δράση των κατάλληλων αναγωγασών, ενώ ο σχηματισμός του σουλφονίου είναι μη αντιστρεπτός. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, ότι η οξείδωση των καταλοίπων μεθειονίνης σε ένζυμα δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη λειτουργία τους (Levine et al., 1996). Η οξείδωση των καταλοίπων μεθειονίνης στα βιολογικά συστήματα θα μπορούσε να αποτελέσει σύστημα δέσμευσης των ROS για να προστατεύσει τις πρωτεΐνες από εκτεταμένες τροποποιήσεις (Roche et al., 2008). Τέλος, η αλβουμίνη εξουδετερώνει το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το οποίο σχηματίζεται από τη μυελοπεροξειδάση κατά τη δράση των ουδετερόφιλων και είναι ισχυρό οξειδωτικό (Halliwell, 1988; Winterbourn et al., 2000).



**Εικόνα 12:** Το μόριο της αλβουμίνης και οι περιοχές που σχετίζονται με στην αντιοξειδωτική της δράση. Τα 4 κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου στα οποία δεσμεύονται ιόντα μετάλλων είναι με μπλε χρώμα. Το κατάλοιπο της κυστεΐνης (Cys34) είναι με κόκκινο χρώμα. Τα σημεία δέσμευσης των PUFA είναι με μωβ χρώμα (Lys351, Lys475, Arg117), το κατάλοιπο λυσίνης (Lys40) που δεσμεύει τη χολερυθρίνη είναι κίτρινο ενώ τα 6 κατάλοιπα μεθειονίνης (Met329, Met298, Met446, Met548, Met123, Met187) είναι πράσινα.



Κατά τη διάρκεια της αερόβιας εξαντλητικής άσκησης παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν τροποποιήσεις στο μόριο της αλβουμίνης και επηρεάζουν τη διαμόρφωση του μορίου και τις δεσμευτικές του ικανότητες (Halliwell & Gutteridge, 2007; Lamprecht et al., 2008). Υπάρχουν μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει την επίδραση της έντονης άσκησης στο οξειδοαναγωγικό σύστημα της ανθρώπινης αλβουμίνης του ορού (Imai et al., 2002; Lamprecht et al., 2008, 2009). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η έντονη άσκηση αυξάνει την οξειδωμένη αλβουμίνη (Imai et al., 2002) και οι οξειδωτικές τροποποιήσεις εξαρτώνται από την ένταση της άσκησης (Lamprecht et al., 2008, 2009). Επιπλέον, η οξειδωμένη αλβουμίνη έχει προταθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες (Lamprecht et al., 2009). Γενικά, τα επίπεδα θειόλης είναι αξιόπιστος δείκτης οξειδωτικού στρες (Quinlan et al., 1994). Όμως, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί το οξειδωτικό στρες χρησιμοποιώντας χαμηλού μοριακού βάρους θειόλες, διότι είναι ευαίσθητες στην οξειδωτική καταστροφή και η μέτρησή τους δεν είναι εύκολη, ιδιαίτερα στο αίμα. Παρόλα αυτά, η μέτρηση σταθερά οξειδωμένων ομάδων θειόλης, όπως τα διμερή της αλβουμίνης, είναι πιο πρακτική (Ogasawara et al., 2006). Τα διμερή της αλβουμίνης είναι οξειδωμένα προϊόντα που προέρχονται από την αντίδραση με υπεροξείδια με αποτέλεσμα η παρουσία τους στους ιστούς να αποτελεί ένδειξη οξειδωτικού στρες (Ogasawara et al., 2006). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η διμερής αλβουμίνη σχηματίζεται στο ανθρώπινο πλάσμα μετά την έκθεση σε οξειδωτικά και σε ασθενείς με αιμόλυση, μια νεφρική ασθένεια στην οποία εμφανίζεται οξειδωτικό στρες (Ogasawara et al., 2006).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες στο πεδίο της βιοχημείας της άσκησης έχει επιβεβαιωθεί ότι η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Ένα από τα κυριότερα ένζυμα, που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι η οξειδάση της ξανθίνης. Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο, το ουρικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο ρόλος του ενζύμου, δηλαδή, είναι διττός καθώς μπορεί μεν να προάγει το οξειδωτικό στρες, λόγω της παραγωγής ελευθέρων ριζών αλλά και να ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών, επειδή οδηγεί στη παραγωγή ουρικού οξέος. Σκοπός, λοιπόν, της εργασίας αυτής ήταν να ερευνηθεί, μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης με χορήγηση του αναστολέα αλοπουρινόλη, αν το ουρικό οξύ ή οι ελεύθερες ρίζες είναι τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη σημασία στην απόδοση. Τα αποτελέσματα της έρευνας αναμένεται να βοηθήσουν στην κατανόηση της σημασίας της ενεργοποίησης της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη διάρκεια της άσκησης. Επίσης, μέσω της αναστολής της δραστηριότητάς της τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* αναμένεται να αποτελέσει μία πολύ σημαντική προκαταρκτική μελέτη σχετικά με το είδος και τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών, που πρέπει να χορηγούνται πριν την άσκηση. Πιο συγκεκριμένα, τα ερωτήματα/στόχοι της διατριβής συνοψίζονται παρακάτω.

- Οι επιδράσεις της *in vivo* αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης στην απόδοση και σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα και σε ιστούς επιμύων πριν την άσκηση από ένα συνθετικό αναστολέα της, την αλοπουρινόλη, οφείλονται στην αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών ή του ουρικού οξέος;
- Υπάρχουν δείκτες οξειδωτικού στρες, που όταν μετρηθούν στο αίμα αντανακλούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών και κυρίως του σκελετικού μύος;
- Υπάρχουν *in vitro* φυτικής προέλευσης αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης και άλλων ενζύμων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες;
- Επιβεβαιώνονται οι *in vitro* αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός φυτικής προέλευσης αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση καθώς και στην αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου αυτού μετά από *in vivo* χορήγησή του σε επίμυες πριν την άσκηση;

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## **1. Πειραματόζωα και πειραματικός σχεδιασμός**

### **1.1. Άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης σε επίμυες**

Για τη διενέργεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 80 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar (ηλικίας 8 εβδομάδων και βάρους  $220 \pm 10$  g,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ), οι οποίοι αποκτήθηκαν από το ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Οι επίμυες διαβιούσαν σε κλουβιά των 3 κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (δωδεκάωρος κύκλος φωτός - σκοταδιού και θερμοκρασία  $20^{\circ}$ - $24^{\circ}\text{C}$ ). Η τροφή και το νερό παρέχονταν στους επίμυες ελεύθερα σε όλη τη διάρκεια του 24ώρου.

Η αλοπουρινόλη χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε μία δόση των  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  σωματικού βάρους 1,5 h πριν από την έναρξη του πρωτοκόλου, γιατί τόση ώρα χρειάζεται περίπου για να επιτευχθεί η μέγιστη συγκέντρωσή της στο αίμα και τον ιστό, σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Για να αυξηθεί η πιθανότητα να βρεθούν επιδράσεις της αλοπουρινόλης στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ιστών, χορηγήθηκε υψηλή δόση σε σχέση με τα  $32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , που χορηγήθηκαν σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005) και τα  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  σωματικού βάρους, που χορηγήθηκαν στον άνθρωπο σε προηγούμενες μελέτες (Gomez-Cabrera et al., 2003, 2006). Η αλοπουρινόλη διαλύθηκε σε διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO), καθώς δεν είναι δυνατό να διαλυθεί σε φυσιολογικό ορό ή μίγμα φυσιολογικού ορού και DMSO. Το DMSO είναι ένας καλός διαλύτης της αλοπουρινόλης και έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα με ανθρώπους (Lee & Wang, 1999). Η ομάδα που θανατώθηκε πριν ασκηθεί και, στην οποία χορηγήθηκε DMSO θεωρήθηκε η ομάδα ελέγχου (control). Προκαταρκτικά πειράματα επιβεβαίωσαν την ανάγκη ύπαρξης μίας μόνο ομάδας ελέγχου καθώς δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στις εξαρτημένες μεταβλητές (δείκτες οξειδωτικού στρες) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Προκαταρκτικά πειράματα, επίσης, έδειξαν ότι η χορήγηση DMSO δεν επηρέασε τις τιμές των δεικτών σε κανένα χρονικό σημείο (Πίνακες 1-3).

**Πίνακας 1.** Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα (mean ± SEM) των προκαταρκτικών πειραμάτων σε 4 επίμνες που θανατώθηκαν πριν ή σε 3 χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DMSO.

	XO (U/mL)	Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg pr)	TBARS (μmol/L)	TAC (mmol/L)
Πριν	0,016 ± 0,002	0,29 ± 0,02	10,1 ± 0,4	0,801 ± 0,003
1,5h	0,015 ± 0,001	0,25 ± 0,01	10,5 ± 0,3	0,813 ± 0,001
2,5h	0,016 ± 0,001	0,25 ± 0,02	11,4 ± 0,6	0,799 ± 0,003
7,5h	0,016 ± 0,001	0,27 ± 0,02	10,1 ± 0,3	0,788 ± 0,004

DMSO, διμεθύλσουλφοξείδιο; XO, οξειδάση της ξανθίνης; TBARS, ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ; TAC, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

**Πίνακας 2.** Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα (mean ± SEM) των προκαταρκτικών πειραμάτων σε 4 επίμνες που θανατώθηκαν πριν ή σε 3 χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DMSO.

	Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg Hb)	TBARS (μmol/g Hb)	GSH (μmol/g Hb)	GSSG (μmol/g Hb)	GSH/GSSG	Καταλάση (U/mg Hb)
Πριν	2,2 ± 0,05	0,47 ± 0,02	2,2 ± 0,0001	0,262 ± 0,015	7,8 ± 0,5	135,1 ± 1,9
1,5h	2,1 ± 0,05	0,43 ± 0,01	2,0 ± 0,0001	0,259 ± 0,015	7,8 ± 0,5	132,7 ± 1,8
2,5h	2,0 ± 0,04	0,45 ± 0,02	2,4 ± 0,0003	0,265 ± 0,013	7,8 ± 0,4	133,8 ± 2,7
7,5h	2,1 ± 0,04	0,44 ± 0,02	2,1 ± 0,0002	0,257 ± 0,015	7,9 ± 0,5	133,5 ± 1,9

DMSO, διμεθύλσουλφοξείδιο; TBARS, ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ; GSH, ανηγμένη γλουταθειόνη; GSSG, οξειδωμένη γλουταθειόνη.

**Πίνακας 3.** Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ (mean ± SEM) των προκαταρκτικών πειραμάτων σε 4 επίμνες που θανατώθηκαν πριν ή σε 3 χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση DMSO.

	XO (mU/mg pr)	Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg pr)	TBARS (nmol/mg pr)	TAC (mmol/mg pr)	GSH (μmol/mg pr)	GSSG (μmol/mg pr)	GSH/GSSG	Καταλάση (U/mg pr)
Πριν	0,310 ± 0,006	1,12 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,116 ± 0,005	0,0402 ± 0,0003	0,0012 ± 0,09	33,5 ± 1,6	4,95 ± 0,08
1,5h	0,302 ± 0,006	1,09 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,108 ± 0,002	0,0403 ± 0,0002	0,0012 ± 0,01	34,7 ± 0,4	4,87 ± 0,04
2,5h	0,299 ± 0,008	1,12 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,110 ± 0,002	0,0404 ± 0,0002	0,0011 ± 0,07	35,8 ± 1,2	5,01 ± 0,09
7,5h	0,303 ± 0,006	1,10 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,109 ± 0,003	0,0402 ± 0,0002	0,0011 ± 0,06	36,5 ± 1,2	4,86 ± 0,08

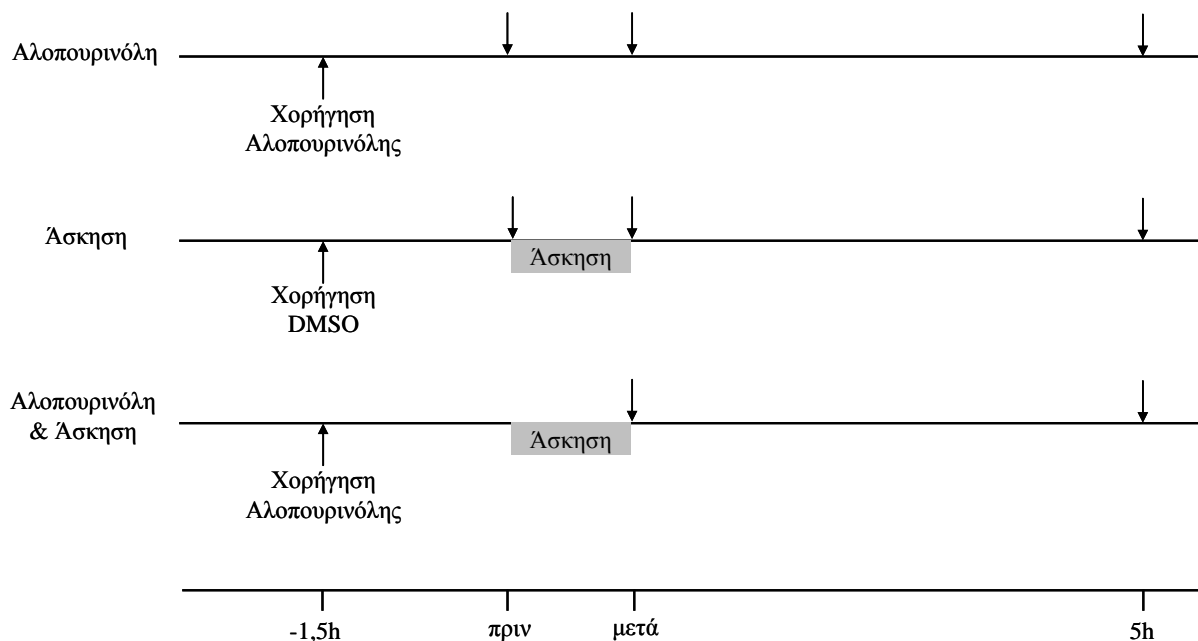
DMSO, διμεθύλσουλφοξείδιο; XO, οξειδάση της ξανθίνης; TBARS, ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ; GSH, ανηγμένη γλουταθειόνη; GSSG, οξειδωμένη γλουταθειόνη; TAC, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Βασιζόμενοι σε προηγούμενα δεδομένα, που δείχνουν ότι οι δείκτες οξειδωτικού στρες αυξήθηκαν αμέσως μετά όσο και μερικές ώρες μετά την άσκηση τόσο στον άνθρωπο (Michailidis et al., 2007) όσο και σε επίμυες (Koyama et al., 1999), επιλέχθηκε η συλλογή των προς μελέτη δειγμάτων αμέσως μετά και 5 h μετά την άσκηση. Στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε DMSO η άσκηση διήρκησε περίπου 1 h.

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 8 ομάδες των 10 ατόμων ως ακολούθως (Εικόνα 13):

- α) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και θανατώθηκαν 1,5 h μετά τη χορήγηση (ομάδα ελέγχου),
- β) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, 1,5 h μετά ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση,
- γ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, 1,5 h μετά ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 5 h μετά την άσκηση,
- δ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, 1,5 h μετά ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση,
- ε) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, 1,5 h μετά ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 5 h μετά την άσκηση,
- στ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 1,5 h μετά τη χορήγηση,
- ζ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 2,5 h μετά τη χορήγηση,
- η) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 7,5 h μετά τη χορήγηση.

Οι επίμυες που θανατώθηκαν 5 h μετά την άσκηση είχαν ελεύθερη πρόσβαση στο νερό και την τροφή.



**Εικόνα 13.** Πειραματικός σχεδιασμός του πειράματος χορήγησης αλοπουρινόλης. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω εκφράζουν τη θανάτωση 10 επιμύων.

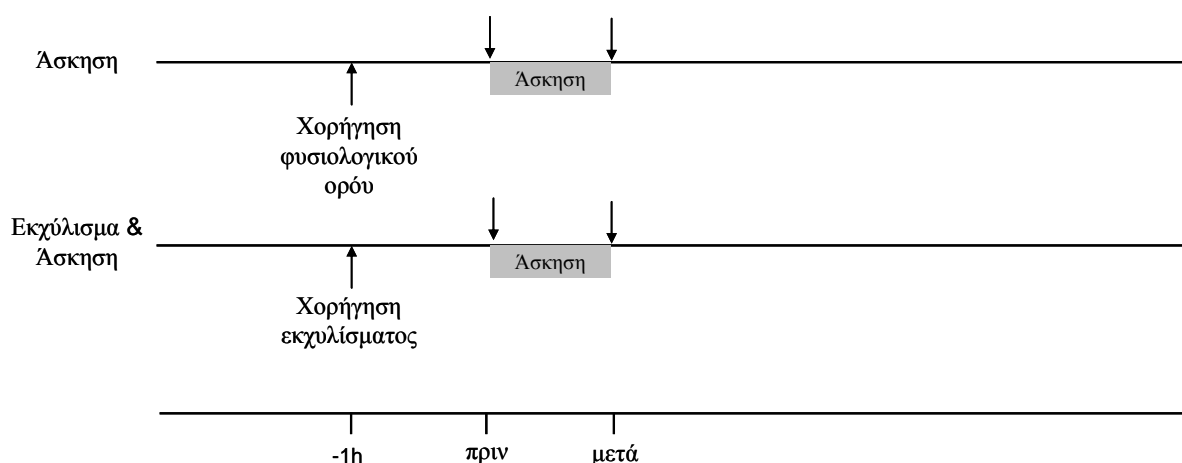
### 1.2. Άσκηση και χορήγηση φυτικού εκχυλίσματος σε επίμυες

Για τη διενέργεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 40 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar (ηλικίας 9 εβδομάδων και βάρους  $285 \pm 5$  g,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ). Οι επίμυες αποκτήθηκαν, επίσης, από το ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ και διαβιούσαν σε συνθήκες όμοιες με εκείνες που προαναφέρθηκαν. Το εκχύλισμα, που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από τον καρπό του σταφυλιού της ποικιλίας μπατίκι Τυρνάβου και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε μία δόση  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  σωματικού βάρους 1 h πριν από την έναρξη του πρωτοκόλου. Η συγκέντρωση αυτή είναι μία μέση συγκέντρωση που αναφέρεται στη βιβλιογραφία σε πειράματα χορήγησης φυτικών εκχυλισμάτων στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα. Είναι γνωστό ότι τα σταφύλια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Το εκχύλισμα, που χορηγήθηκε είχε ως κύριο συστατικό του την κατεχίνη (η σύστασή του αναφέρεται στο παράρτημα). Έχει αναφερθεί ότι 1 h είναι αρκετή για να παρατηρηθεί η μέγιστη συγκέντρωση των περισσότερων πολυφαινόλων τουλάχιστον στο αίμα και να παρατηρηθούν οι πιθανές επιδράσεις τους (Manach et al., 2005).



Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες των 10 ατόμων ως ακολούθως (Εικόνα 14):

- α) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και θανατώθηκαν 1h μετά τη χορήγηση,
- β) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, 1h μετά ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση,
- γ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα και θανατώθηκαν 1h μετά τη χορήγηση,
- δ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα, 1h μετά ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.



**Εικόνα 14.** Πειραματικός σχεδιασμός του πειράματος χορήγησης εκχυλίσματος. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω εκφράζουν τη θανάτωση 10 επιμύων.

### 1.3. Εξοικείωση των επιμύων με το νερό

Οι επίμυες και στα δύο πειράματα εγκλιματίστηκαν για μία βδομάδα στο χώρο του πειράματος και στη συνέχεια εξοικειώθηκαν με την κολύμβηση για μια περίοδο 5 ημερών πριν εφαρμοστεί το πειραματικό πρωτόκολο. Την πρώτη μέρα της εξοικείωσης οι επίμυες έμειναν στο νερό για 10 min χωρίς την προσθήκη βάρους στη βάση της ουράς τους. Τις επόμενες δύο μέρες κολύπησαν με βάρος ίσο με το 1% του σωματικού τους βάρους προσδεδεμένο στη βάση της ουράς τους και τις επόμενες δύο μέρες το βάρος αυτό αυξήθηκε στο 2%. Τρεις μέρες πριν το πείραμα οι επίμυες παρέμειναν στα κλουβιά τους χωρίς να κάνουν καθόλου άσκηση.

#### *1.4. Πρωτόκολλο άσκησης*

Οι επίμυες κολύμπησαν ο καθένας ξεχωριστά μέχρι εξάντλησης σε ειδικά κατασκευασμένες δεξαμενές (διάμετρος 1,0 m, βάθος 0,7 m) σε νερό θερμοκρασίας 33-36°C. Η θερμοκρασία αυτή θεωρείται κατάλληλη, καθώς δεν παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα των επιμύων κι έτσι δεν επηρεάζεται η απόδοσή τους (Dawson et al., 1968). Σταθερό βάρος ίσο με το 4% του σωματικού τους βάρους προσδέθηκε στη βάση της ουράς τους για να επιτευχθεί συνεχής άσκηση. Το βάρος αυτό είναι φυσιολογικό και χρησιμοποιείται σε ανάλογες μελέτες (Araujo et al., 2006). Ακολούθως, μετρήθηκε η απόδοση των επιμύων. Ένας επίμυς θεωρήθηκε ότι είχε φτάσει στο σημείο εξάντλησης όταν δεν μπορούσε να διατηρήσει τη μύτη του έξω από το νερό. Η άσκηση επιλέχθηκε να γίνει μέχρι εξάντλησης, επειδή έχει αναφερθεί ότι η ένταση είναι σημαντικός παράγοντας για την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Palmer et al., 2003; McBride & Kraemer, 1999). Το κολύμπι επιλέχθηκε καθώς, σε αντίθεση με το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο, προκαλεί πολύ μικρή μυϊκή καταστροφή (Komulainen et al., 1995). Έτσι, οι επιδράσεις που βρέθηκαν δεν αποδίδονται στη μυϊκή καταστροφή, η οποία είναι γνωστό ότι οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, αλλά στις παρεμβάσεις που εφαρμόστηκαν (Nikolaidis et al., 2008).

#### *1.5. Θανάτωση των επιμύων και συλλογή των ιστών*

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό αφού προηγουμένως εκτέθηκαν για λίγο σε αιθέρα. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια με EDTA, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν αμέσως στα 1370 g για 10 min στους 4°C για τη λήψη του πλάσματος. Στα ερυθροκύτταρα, που έμειναν στον πυθμένα προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1 (v/v), τα σωληνάρια ανακινήθηκαν βίαια και φυγοκεντρήθηκαν στα 4020 g για 15 min στους 4°C. Το υπερκείμενο, που αποτελεί το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, συλλέχθηκε. Η λήψη των ιστών έγινε χειρουργικά και ακολούθως τοποθετήθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο. Τα δείγματα αίματος και ιστού έμειναν σε βαθειά ψύξη (-80°C) μέχρι να αναλυθούν. Η ομογενοποίηση των ιστών έγινε με γουδί και γουδοχέρι παρουσία υγρού αζώτου. Ένα μέρος (mg) κονιορτοποιημένου ιστού αναμίχθηκε με δύο μέρη (μL) διαλύματος PBS pH 7,4 (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl και 1 mM EDTA) και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (1 μM απροτινίνη, 1 μg/ml λιουπεπτίνη και 1 mM PMSF). Ο ομογενοποιημένος ιστός ανακινήθηκε βίαια, υπέστη

σπάσιμο με υπερήχους, φυγοκεντρήθηκε στα 12000 g για 30 min στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο.

## **2. Πρωτόκολα δεικτών εκτίμησης του οξειδωτικού στρες**

### **2.1. Χημικά αντιδραστήρια**

Τα χημικά αντιδραστήρια 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine, DPPH:H), 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), αναγωγή της γλουταθειόνης από ζυμομύκητα (GR), οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), η XO από γάλα βοδιού, 2-vinyl-pyridine, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) και Bradford αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το τριχλωροξικό οξύ (TCA) και το διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/v) αποκτήθηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany).

### **2.2. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων**

Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford, το οποίο περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, που όταν αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα σχηματίζει ένα μπλε προϊόν (Bradford, 1976). Για την ποσοτική εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης, σε 20 μL δείγματος αραιωμένου 1/20 προστέθηκε 1 mL αντιδραστηρίου Bradford και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 595 nm, όπως αναφέρουν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης βασίζεται σε μία πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης (50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 μg/mL), που αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

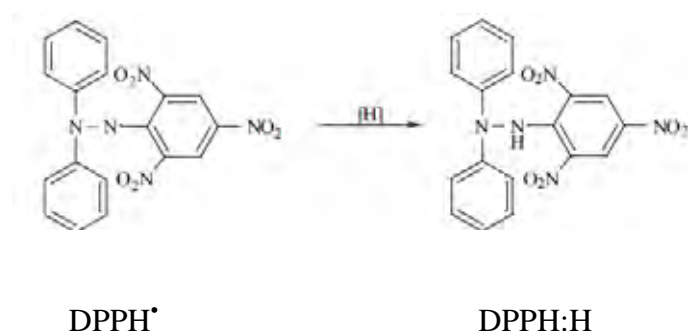
### **2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων έγινε φασματοφωτομετρικά με το kit της εταιρείας Drabkin, όπως αναφέρουν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

### **2.4. Προσδιορισμός της TAC**

Ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska & Bartosz, (2002). Η TAC είναι ένας γενικός δείκτης, που συνυπολογίζει τη δράση της

πλειονότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών των ιστών. Η μέθοδος βασίζεται στην εξουδετέρωση της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των δειγμάτων, η οποία μετατρέπεται στην αντίστοιχη υδραζίνη, DPPH:H (Εικόνα 15). Έχει βρεθεί ότι στη συγκεκριμένη μέθοδο η συνεισφορά του ουρικού οξέος στο πλάσμα φτάνει σε ποσοστό 58% (Wayner et al., 1987) με αποτέλεσμα να αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο παρατήρησης της απόκρισης του ουρικού οξέος σε κάποια παρέμβαση.



**Εικόνα 15.** Η αναγωγή της ρίζας DPPH<sup>•</sup> στο σταθερό μόριο DPPH:H.

Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της TAC στους προς μελέτη ιστούς και το πλάσμα κυμαινόταν από 0,2 έως 1,4 mg. Η ποσότητα του ιστού προστέθηκε σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 5 mM (pH 7,4) και διάλυμα της ρίζας DPPH<sup>•</sup> συγκέντρωσης 0,05 mM και τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στα 20000 g για 3 min στους 25°C και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 520 nm. Η TAC παρουσιάζεται ως mmol της ρίζας DPPH<sup>•</sup>, που ανάχθηκαν στην υδραζίνη DPPH:H από τα αντιοξειδωτικά των ιστών ανά mg πρωτεΐνης, είτε ως mmol της ρίζας DPPH<sup>•</sup> ανά λίτρο πλάσματος.

#### *Υπολογισμοί*

##### *Στο πλάσμα*

ii) mmol DPPH<sup>•</sup> που εξουδετερώθηκαν / L πλάσματος =  $[(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού}] \times 50 \times 50 / 1000$ .

Διαιρούμε με 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης, πολλαπλασιάζουμε με 50 διότι η

συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50  $\mu\text{mol/L}$ , πολλαπλασιάζουμε με 50, που είναι ο συντελεστής αραίωσης και διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL.

*Στους ιστούς*

ii)  $\text{mmol DPPH}^{\bullet}$  που εξουδετερώθηκαν / mg ολικής πρωτεΐνης =  $[(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού}] \times 50 \times a \times 3 / 1000$ .

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραίωσης και της αραίωσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.

## *2.5. Προσδιορισμός της δραστικότητας της XO.*

Η δραστικότητα της XO υπολογίστηκε όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (Prajda & Weber, 1975; Veskoukis et al., 2006). Στη μέθοδο αυτή, η δραστικότητα του ενζύμου υπολογίστηκε μέσω του ρυθμού παραγωγής του ουρικού οξέος από την οξείδωση της ξανθίνης.

Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της δραστικότητας της XO στους προς μελέτη ιστούς και το πλάσμα κυμαινόταν από 1 έως 2 mg. Η ποσότητα του ιστού προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 29 mM (pH 7,5) και διάλυμα ξανθίνης συγκέντρωσης 0,17 mM και η αντίδραση σταμάτησε αμέσως με την προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  100% TCA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10000 g για 15 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 293 nm. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και η αντίδραση σταμάτησε όπως πριν αφού το δείγμα είχε επωαστεί για 20 min στους 37°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και η μέτρηση της απορρόφησης στα 293 nm. Η δραστικότητα της XO υπολογίστηκε αφαιρώντας τη δραστικότητα του πρώτου δείγματος από το δεύτερο. Ο υπολογισμός της δραστικότητας της XO βασίστηκε στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης του ουρικού οξέος.

### Υπολογισμοί

#### Στο πλάσμα

Δραστικότητα της XO (U/mL) =  $(\text{Abs}_{\text{sample } 20\text{min στο λεπτό}} - \text{Abs}_{\text{sample } 0\text{min στο λεπτό}} / 20 / 12,2) \times 55$ ).

Όπου, το 12,2 ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του ουρικού οξέος, το 55 είναι ο συντελεστής αραιώσης ενώ διαιρούμε με 20 για τον υπολογισμό της δραστικότητας της XO στο λεπτό.

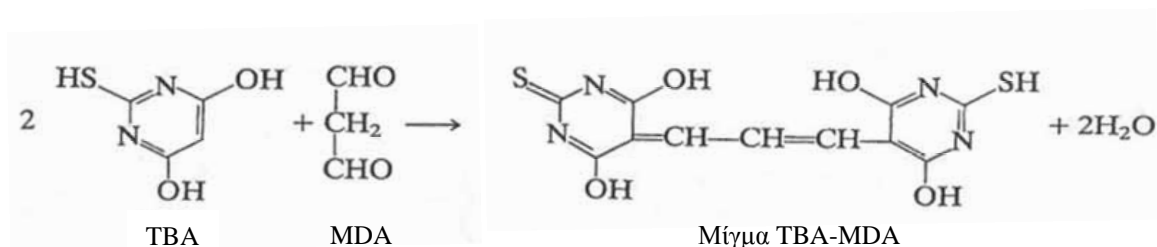
#### Στους ιστούς

Δραστικότητα της XO (U/mg ολικής πρωτεΐνης) =  $(\text{Abs}_{\text{sample } 20\text{min στο λεπτό}} - \text{Abs}_{\text{sample } 0\text{min στο λεπτό}} / 20 / 12,2) \times 27,5 \times 3 \times a$ ).

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραιώση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραιώσης και της αραιώσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.

### 2.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των TBARS

Η συγκέντρωση των TBARS προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001). Ο δείκτης αυτός χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης. Σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες παράγονται εξαιρετικά ενεργά και ασταθή λιπιδικά υπεροξείδια, η αποσύνθεση των οποίων οδηγεί στο σχηματισμό της MDA. Η MDA υπολογίζεται ποσοτικά κατά τη δέσμευσή της με TBA σε αναλογία 1:2 (Εικόνα 16).



**Εικόνα 16.** Η ένωση του TBA με την MDA οδηγεί στο σχηματισμό μίγματος (TBARS).

Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των TBARS στους προς μελέτη ιστούς και το πλάσμα κυμαινόταν από 0,5 έως 7 mg και η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν 75 mg. Η ποσότητα του ιστού αναμίχθηκε με 500  $\mu\text{L}$  TCA 35% και με διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 91 mM (pH 7,4) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε μίγμα  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  συγκέντρωσης 0,95 M και TBA συγκέντρωσης 26 mM και τα δείγματα επωάστηκαν στους 95°C για 45 min. Ακολούθως, έμειναν για 5 min στον πάγο, προστέθηκε 1 mL TCA 70%, φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 3 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 530 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των TBARS έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA.

#### *Υπολογισμοί*

##### *Στο πλάσμα*

Η συγκέντρωση των TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156  $\times$  31.

Το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, το 0,156 ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA.

##### *Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα*

Η συγκέντρωση των TBARS ( $\mu\text{mol/g Hb}$ ) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156  $\times$  31  $\times$  2. (Hb: αιμοσφαιρίνη).

Το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης και το 2 προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων με απιονισμένο νερό.

##### *Στους ιστούς*

Η συγκέντρωση των TBARS ( $\text{nmol/mg ολικής πρωτεΐνης}$ ) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156  $\times$  a  $\times$  3.

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραίωσης και της αραίωσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.

## *2.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της MDA*

Η συγκέντρωση της MDA ως δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης έγινε σύμφωνα με τους Botsoglou et al. (1994). Αυτή η μέθοδος ποσοτικής εκτίμησης της λιπιδικής υπεροξείδωσης θεωρείται πιο άμεση από την προηγούμενη και βασίζεται πάλι στην αντίδραση της MDA με το TBA. Ωστόσο, υπολογίζει μόνο την MDA ενώ στην προηγούμενη μέθοδο είναι πιθανό να αντιδρούν και άλλες ενώσεις πέρα από την MDA. Πειραματικά, η ποσότητα πρωτεΐνης του ιστού που χρησιμοποιήθηκε κυμαινόταν από 1,25 έως 2,5 mg. Η ποσότητα αυτή αναμίχθηκε με 2,9% TCA και 2,9 % BHT, ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 g για 3 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 900  $\mu$ L 5% TCA και χωρίστηκαν σε 3 δείγματα όγκου 625  $\mu$ L το καθένα. Ακολούθως προστέθηκαν 375  $\mu$ L 0,8% TBA (ή 625  $\mu$ L 5% TCA για το τυφλό), επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 70°C για 30 min και μεταφέρθηκαν για 10 min στον πάγο ώστε να κρυώσουν. Ακολούθησε φυγοκέντρωση 3000 g για 3 min στους 4°C και φωτομέτρηση στα 521,5 nm. Η συγκέντρωση της MDA προσδιορίστηκε με βάση καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων MDA. Η συγκέντρωση της MDA εκφράστηκε ως  $\mu$ g/mg ολικής πρωτεΐνης και πολλαπλασιάστηκε με a, που είναι η αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση.

## *2.8. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων*

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως δείκτης πρωτεϊνικής οξειδωσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι επιρρεπή στην οξειδωτική καταστροφή. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων Pro, Arg, Lys και Thr και είναι αρκετά σταθερά μόρια. Όταν οι πρωτεΐνες καρβονυλιώνονται καταστρέφονται μη αντιστρεπτά και χάνουν τη φυσιολογική τους λειτουργία.

Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους προς μελέτη ιστούς και το πλάσμα κυμαινόταν από 2,5 έως 7,5 mg και η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν 3 mg. Η ποσότητα του ιστού προστέθηκε σε 50  $\mu$ L TCA 20%, το μίγμα επώαστηκε στον πάγο για 15 min και φυγοκεντρήθηκε στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε DNPH (διαλυμένο σε 2,5 N HCL) συγκέντρωσης 10 mM για τα δείγματα ή HCL συγκέντρωσης 2,5 N για τα τυφλά καθώς κάθε δείγμα είχε το



δικό του τυφλό. Τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι για 1 h με ανακίνηση κάθε 15 min και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1 mL TCA 10%, τα δείγματα ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, στο ίζημα προστέθηκε 1 mL μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v), τα δείγματα ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμη 2 φορές. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, στο ίζημα προστέθηκε 1 mL ουρίας συγκέντρωσης 5 M, τα δείγματα ανακινήθηκαν, επωάστηκαν στους 37°C για 15 min, φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 375 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPH.

#### *Υπολογισμοί*

##### *Στο πλάσμα*

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg ολικής πρωτεΐνης) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,022 × 20.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 0,022 (nM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) και το 20 είναι ο συντελεστής αραίωσης.

##### *Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα*

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg Hb) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,022 × 20 × 2 × 10.

Το 2 προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων με απιονισμένο νερό και το 10 αναφέρεται στην 1/10 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση.

##### *Στους ιστούς*

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg ολικής πρωτεΐνης) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,022 × a × 3.

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραίωσης και της αραίωσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.



### *Υπολογισμοί*

#### *Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα*

Συγκέντρωση της GSH (nmol/g Hb) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού / 13,6) × 262,6.

Το 262,6 είναι ο συντελεστής αραίωσης πολλαπλασιαζόμενος με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 × 1,3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη και τη δεύτερη αραίωση με 5% TCA για τον καθαρισμό του αιμολύματος. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

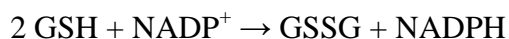
#### *Στους ιστούς*

Συγκέντρωση της GSH (μmol/mg ολικής πρωτεΐνης) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού / 13,6) × 3 × a.

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραίωσης και της αραίωσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.

### *2.10. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG*

Η GSSG προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον Tietze (1969). Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή της GSSG σε GSH από την GR. Πιο συγκεκριμένα, με την προσθήκη του αντιδραστηρίου 2-βινυλ πυριδίνη παρεμποδίζεται η οξείδωση της GSH σε GSSG. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη της αναγωγάσης της γλουταθειόνης που μετατρέπει την GSSG σε GSH, η οποία οξειδώνει το DTNB σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο είναι έγχρωμο και φωτομετρικά ανιχνεύσιμο προϊόν. Η αντίδραση που πραγματοποιείται με τη συμμετοχή του αναγωγικού μέσου NADPH είναι η κάτωθι:



Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της GSSG στους προς μελέτη ιστούς ήταν 2,5 mg και η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν 75 mg. Η ποσότητα του ιστού αναμίχθηκε με ίσο όγκο TCA 5% και το pH ρυθμίστηκε στο 7,0-

7,5 με NaOH. Ακολούθως, προστέθηκε 1  $\mu\text{L}$  2-vinyl pyridine και τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Μετά, ποσότητα ιστού με περιεχόμενη ποσότητα πρωτεΐνης από 0,3 έως 0,6 mg ή ποσότητα ερυθροκυτταρικού αιμολύματος με ποσότητα πρωτεΐνης από 9 έως 18 mg αναμίχθηκε με διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 86 mM (4,2 mM EDTA, pH 7,5), διάλυμα NADPH συγκέντρωσης 0,3 mM, διάλυμα DTNB συγκέντρωσης 1 mM και απιονισμένο νερό προς συμπλήρωση του επιθυμητού όγκου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα GSSG συγκέντρωσης 0,75  $\mu\text{M}$ . Τα δείγματα επωάστηκαν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά την προσθήκη 1  $\mu\text{L}$  ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412 nm για 1 min. Η συγκέντρωση της GSSG υπολογίστηκε με βάση τη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος GSSG γνωστής συγκέντρωσης.

#### *Υπολογισμοί*

##### *Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα*

Η συγκέντρωση της GSSG ( $\mu\text{mol/g}$  αιμοσφαιρίνης) =  $[(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) \times 0,75] / (\text{Abs πρότυπου} - \text{Abs τυφλού}) \times 936] / 2/1000$ .

όπου το 936 είναι ο συντελεστής αραίωσης πολλαπλασιαζόμενος με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με  $2 \times 1,3$  για να συνυπολογίσουμε την πρώτη και τη δεύτερη αραίωση με 5% TCA για τον καθαρισμό του αιμολύματος, με 0,9 για να λάβουμε υπόψη την αραίωση από το NaOH και το 2-vinyl pyridine στη διόρθωση του pH. Ακολούθως διαιρούμε με 2 για να συνυπολογίσουμε τη στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης ( $2 \text{ GSH} \rightarrow 1 \text{ GSSG}$ ) και διαιρούμε με 1000 για να μετατρέψουμε τα  $\mu\text{L}$  σε mmol. Το 0,75 $\mu\text{M}$  είναι η συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος GSSG.

##### *Στους ιστούς*

Η συγκέντρωση της GSSG ( $\text{nmol/mg}$  ολικής πρωτεΐνης) =  $[(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) \times 0,75] / (\text{Abs πρότυπου} - \text{Abs τυφλού}) \times 3 \times a \times 0,9] / 2/1000$ .

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραίωσης και της αραίωσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.

### 2.11. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης.

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Aebi (1984). Στη μέθοδο αυτή η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε από το ρυθμό διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα του ενζύμου καθώς η καταλάση καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) σε νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ) και οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της δραστηριότητας της καταλάσης στους προς μελέτη ιστούς κυμαινόταν από 0,1 έως 1 mg και η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν 1,2 mg. Η ποσότητα του ιστού αναμίχθηκε με διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 67 mM (pH 7,4) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 10 min. Ακολούθως, προστέθηκε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  συγκέντρωσης 0,05% στα δείγματα και η μεταβολή της απορρόφησης μετρήθηκε στα 240 nm για 2min. Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### Υπολογισμοί

##### Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Δραστηριότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ( $\Delta\text{Abs}$  δείγματος στο λεπτό / 40)  $\times$  ( $750 \times 1000 \times 10 \times 2$ ).

Το 40 ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ , το 750 είναι ο συντελεστής αραίωσης, το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

##### Στους ιστούς

Δραστηριότητα της καταλάσης (U/mg ολικής πρωτεΐνης) = ( $\Delta\text{Abs}$  δείγματος στο λεπτό / 40)  $\times$  ( $75 \times 1000 \times 3 \times a$ ).

Πολλαπλασιάζουμε με 3 λαμβάνοντας υπόψη την 1/3 αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του και με a, που είναι το γινόμενο του συντελεστή αραίωσης και της αραίωσης του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο αριθμός αυτός είναι διαφορετικός για κάθε ιστό.

## *2.12. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αλβουμίνης*

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Doumas et al. (1971). Σύμφωνα με αυτό, η προσθήκη του δείγματος σε διάλυμα χρωστικής πράσινο της βρωμοκρεσόλης παρουσία ηλεκτρικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης.

Πειραματικά, η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στους προς μελέτη ιστούς και το πλάσμα κυμαινόταν από 0,25 έως 0,35 mg. Το δείγμα προστίθεται σε μίγμα που περιέχει διάλυμα χρωστικής συγκέντρωσης 0,15 mM, διάλυμα ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0,075 M και διάλυμα Brij-35 συγκέντρωσης 0,12%. Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 628 nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αλβουμίνης βασίζεται σε μία πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης (2, 3, 4, 5 και 6 g/dL). Η συγκέντρωση της αλβουμίνης εκφράστηκε ως mg/mL πλάσματος ή mg/mg ολικής πρωτεΐνης στους ιστούς στους οποίους πολλαπλασιάστηκε με  $a$ , που είναι η αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση.

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι εκτίμησης του οξειδωτικού στρες είναι φασματοφωτομετρικές και οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

## **3. Ανίχνευση της μονομερούς και διμερούς αλβουμίνης στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους *μν* μέσω ανάλυσης *western***

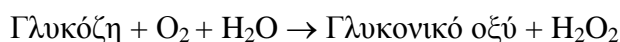
Τα επίπεδα της μονομερούς και της διμερούς αλβουμίνης υπολογίστηκαν στον EDL με ανάλυση *western* χρησιμοποιώντας στην ηλεκτροφόρηση loading buffer με και χωρίς αναγωγικό παράγοντα (reducing και nonreducing SDS loading buffer), αντίστοιχα. Ένας αναγωγικός παράγοντας, όπως η διθειοδρεϊτόλη, προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών διασπώντας τους διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και καταστρέφοντας την τεταρτοταγή τους δομή με αποτέλεσμα να τις διασπά σε ολιγομερή. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χωρίς αναγωγικούς παράγοντες χρησιμοποιείται όταν πρέπει να μελετηθεί η βασική τους δομή καθώς επιτρέπει την ανίχνευση δισουλφιδίων, όπως τα διμερή αλβουμίνης (Sheffield et al., 2005). Αναλυτικότερα, 20  $\mu$ g πρωτεΐνης του ιστού χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση σε ένα πήκτωμα 8% πολυακρυλαμίδιου. Ακολούθως, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF (Millipore, Bedford, Mass.) και διατηρήθηκαν όλο το βράδυ με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα που περιείχε 13 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris (pH 7,5), 150 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl

και 0,2% Tween-20. Την επόμενη μέρα σημάνθηκαν με αντίσωμα για την αλβουμίνη (horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rat albumin antibody (1:1000)) για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι λωρίδες της αλβουμίνης ανιχνεύτηκαν με χημειοφωταύγεια χρησιμοποιώντας Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Waltham, Mass.). Η ποσοτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα Alpha View quantification software (Alpha Innotech, San Leandro, Calif.). Οι μεμβράνες σημάνθηκαν και με αντίσωμα για τη δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από 10 επίμνες.

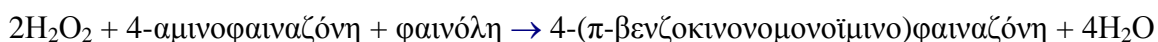
#### **4. Προσδιορισμός της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος του πλάσματος**

##### *Γλυκόζη*

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης έγινε φασματοφωτομετρικά με kit της εταιρείας Centronic (Wartenberg, Γερμανία). Το αντιδραστήριο αναμείχθηκε με το πλάσμα σε αναλογία όγκων 100:1 και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης στηρίχθηκε στη χρήση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 5,55 mmol/L. Η μέθοδος βασίστηκε σε δύο αντιδράσεις: στην πρώτη η γλυκόζη οξειδώνεται προς γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου με οξειδωτικό μέσο το μοριακό οξυγόνο, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Στη δεύτερη αντίδραση, το  $\text{H}_2\text{O}_2$  αντιδρά με δύο οργανικές ενώσεις (4-αμινοφαιναζόνη και φαινόλη) με τη βοήθεια της υπεροξειδάσης. Οι ενώσεις αυτές, αντιδρώντας με το  $\text{H}_2\text{O}_2$  ενώνονται σχηματίζοντας μια έγχρωμη ουσία, της οποίας η συγκέντρωση υπολογίζεται μετρώντας την απορρόφησή της στα 500 nm. Η δεύτερη αντίδραση φαίνεται παρακάτω:



Τα γραμμομόρια της έγχρωμης ουσίας αντιστοιχούν στα γραμμομόρια της γλυκόζης του δείγματος.

### *Γαλακτικό οξύ*

Ο προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος έγινε φασματοφωτομετρικά. Το μετρήσιμο προϊόν της αντίδρασης είναι το NADH, το οποίο απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 340 nm. Ο προσδιορισμός γίνεται σύμφωνα με την αντίδραση :



κάθε δείγμα σε φιαλίδια, που περιείχαν 140  $\mu\text{L}$  0,3 M υπερχλωρικού οξέος ( $\text{HClO}_4$ ). Ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 1500 g για 4 min. Ετοιμάστηκε το διάλυμα εργασίας, που περιέχει NAD, ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης,  $\text{H}_2\text{O}$  και γαλακτική αφυδρογονάση. Σε κάθε πλαστική κυψελίδα προστέθηκαν 725  $\mu\text{L}$  του διαλύματος εργασίας και 25  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο των παραπάνω δειγμάτων. Στην κυψελίδα για το τυφλό προστέθηκαν 25  $\mu\text{L}$  από το  $\text{HClO}_4$ . Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος εκφρασμένη σε mmol/L μετρήθηκε σε μήκος κύματος 340 nm και υπολογίστηκε με βάση τον παράγοντα 28,94 (από το νόμο Beer-Lambert) που προκύπτει από τη συνολική αραίωση του δείγματος επί το συντελεστή γραμμομοριακής απορροφητικότητας ( $\epsilon$ ). Η συνολική αραίωση ήταν 6 φορές στην αντίδραση επί 30 φορές στην κυψελίδα και ο  $\epsilon$  του NADH είναι 6,22. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα προβλεπόμενα 10 min.

## ***5. Προετοιμασία των δειγμάτων του υποκνημίδιου μυός και του ήπατος για τον ιστοχημικό προσδιορισμό του γλυκογόνου***

### ***5.1. Επεξεργασία των δειγμάτων***

Τα δείγματα του υποκνημίδιου μυός και του ήπατος των επιμύων λήφθηκαν χειρουργικά και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% (υδατικό διάλυμα της αέριας φορμαλδεΰδης). Η φορμόλη είναι διάλυμα μονιμοποίησης και συμβάλλει στην αποφυγή των μεταθανάτιων αλλοιώσεων των ιστών, που προκαλούνται λόγω της λύσης των κυττάρων. Πριν την περαιτέρω επεξεργασία των ιστοτεμαχίων έγινε έκπλυση με νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας της φορμόλης. Οι ιστοί που προέκυψαν από την προηγούμενη προετοιμασία περιείχαν νερό, γι' αυτό το λόγο δεν είναι κατάλληλοι για τη λήψη των ιστολογικών τομών. Πρέπει να αφαιρεθεί το νερό και τη θέση του να καταλάβει ένα υλικό που να προσδίδει τον κατάλληλο βαθμό σκληρότητας για τον τεμαχισμό των δειγμάτων. Το πιο κατάλληλο υλικό για το σκοπό αυτό είναι η παραφίνη. Αρχικά έγινε αφυδάτωση των ιστοτεμαχίων με



εμβάπτισή τους σε ανιούσα σειρά 70, 80, 95, και 100 βαθμών αλκοόλης. Μετά την αφυδάτωση ακολούθησε η αντικατάσταση της αλκοόλης από ξυλόλη. που δίνει μια ημιδιαφανή όψη στον μέχρι τότε αδιαφανή ιστό. Κατά το τελικό στάδιο της εμποτίσης των ιστοτεμαχίων με παραφίνη η διαδικασία έγινε σε δοχείο, που διατηρεί την παραφίνη σε υγρή μορφή. Ακολούθησε η λήψη των ιστολογικών τομών από το ήπαρ και το μυ. Η κάθε τομή τοποθετήθηκε σε ένα μικρό διάτρητο πλαστικό καψάκι.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε ειδικό μηχάνημα, την ιστοκινέττα. Αυτή αποτελείται από ειδικά γυάλινα δοχεία, που περιέχουν τις αλκοόλες και την ξυλόλη και δυο κλιβάνους με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, όπου βρίσκεται η λειωμένη παραφίνη. Τα καψάκια με τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε ένα μεταλλικό καλάθι, που μετακινείται και βυθίζεται από το ένα δοχείο στο επόμενο. Μετά τη διαδικασία αυτή ακολούθησε η έγκλειση ή σκλήνωση του ιστοτεμαχίου. Αυτό είναι το στάδιο, στο οποίο ο ιστός φέρεται μέσα στο μέσο έγκλεισης (παραφίνη), το οποίο είναι σε υγρή κατάσταση και στη συνέχεια ακολουθεί η πήξη του μέσου έγκλεισης σε καλούπια. Έτσι, το μέσο έγκλεισης και το εντός αυτού ιστοτεμάχιο αποτελούν ένα συμπαγές σώμα (κύβο παραφίνης ή block), που μπορεί να διατηρηθεί επ'αόριστον. Ο κύβος παραφίνης τοποθετήθηκε στο μικροτόμο παραφίνης, που επιτρέπει τη λήψη πολύ λεπτών και διάφανων στο μικροσκόπιο τομών. Οι τομές αυτές έχουν πάχος 3  $\mu\text{m}$  και επιτρέπουν τη μελέτη των ιστολογικών στοιχείων του παρασκευάσματος.

Οι ιστολογικές τομές μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο επιπλεύσεως ιστών κατάλληλης θερμοκρασίας ώστε η παραφίνη να γίνει μαλακή με συνέπεια την εκτύλιξη των τομών. Οι εκτυλιχθείσες τομές μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες θετικά φορτισμένες για να γίνει καλύτερη συγκόλληση των κυττάρων πάνω στα πλακίδια. Οι τομές που είναι επιστρωμένες πάνω στις πλάκες είναι μερικώς αφυδατωμένες γι' αυτό τοποθετήθηκαν στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37-40°C ώστε να ξηραθούν και να καθηλωθούν πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Από την ξυλόλη τα βαμμένα πλακίδια καλύφθηκαν με καλυπτρίδα με τη χρησιμοποίηση κόλλας Endellan.

## 5.2. Χρώση periodic acid-Schiff (PAS)

Οι τομές του μυός και του ήπατος βάφτηκαν με χρώση PAS σύμφωνα με το πρωτόκολο του McManus (1948). Με τη χρώση αυτή βάφονται το γλυκογόνο, η βλέννη και το υαλουρονικό οξύ. Μερικά από αυτά τα συστατικά με τη χρώση PAS δίνουν μια έντονη χρωματική αντίδραση, ενώ άλλα δίνουν πιο ασθενή αντίδραση. Το

γλυκογόνο κατά την επεξεργασία με τη χρώση βάφεται σε μωβ απόχρωση. Η χρώση αυτή αναγνωρίζει τις ομάδες  $\text{CHOH.CHOH}$ ,  $\text{CHOH.CHNH}_2$ ,  $\text{CHOH.CHNHR}$  στους πολυσακχαρίτες, τις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Η ταυτοποίηση των ομάδων αυτών γίνεται μέσω της παραγωγής των αλδεϋδών λόγω της οξείδωσης του υπεριοδικού οξέος, οι οποίες βάφονται μέσω του αντιδραστήριου Schiff. Το ξέπλυμα ανάμεσα στην οξείδωση του υπεριοδικού οξέος και την εμβάπτιση στο διάλυμα Schiff μειώνει την αντίδραση ανάμεσά τους. Το αντιδραστήριο της αιματοξυλίνης βάφει τον πυρήνα των κυττάρων.

### *5.3. Ημιοσοτική εκτίμηση του μυϊκού γλυκογόνου με τη χρήση του προγράμματος Image J*

Η μικροσκοπική εξέταση των τομών έγινε με μικροσκόπιο Nikon και φωτογραφήθηκαν με φωτογραφική μηχανή υψηλής ανάλυσης COOLPIX. Οι ψηφιακά αποθηκευμένες εικόνες υπέστησαν επεξεργασία με το σύστημα επεξεργασίας εικόνων Image J. Το Image J είναι ένα πρόγραμμα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να μετράει περιοχές ή την ποσότητα των στατιστικών pixels της επιλεγόμενης περιοχής. Μπορεί να μετρήσει αποστάσεις ή και γωνίες και να δημιουργήσει ιστογράμματα. Επιλέγεται μια εικόνα που χρησιμοποιείται ως πρότυπο και κατώτερο όριο μέτρησης για σύγκριση με τις υπόλοιπες εικόνες. Από την εικόνα αυτή επιλέγεται μια περιοχή, αντιγράφεται και επικολλείται πάνω στην προς μέτρηση εικόνα, στην οποία υπάρχουν περιοχές, που αντιστοιχούν σε αναδιπλώσεις της τομής ή σε αρτηρίες, οι οποίες αφαιρούνται.

## **6. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στο πλάσμα**

Η σύσταση σε λιπαρά οξέα των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών των δειγμάτων προσδιορίστηκε με συνδυασμό χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και αέριας χρωματογραφίας.

### *Εκχύλιση λιπιδίων*

Αρχικά, έγινε η εκχύλιση των λιπιδίων από το πλάσμα. Μισό mL πλάσματος αναμείχθηκε με 2,5 mL μείγματος 2-προπανόλης – επτανίου – 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  40:10:1 (v/v/v) αφού πριν είχαν προστεθεί 5  $\mu\text{L}$  δεκαεπτανοϊκού οξέος (1,62  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) και 2  $\mu\text{L}$  τριδεκαεπτανοϋλογλυκερόλης (20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ως εσωτερικά πρότυπα για τη μέτρηση της ποσότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών, αντίστοιχα.

Μετά από 10 min προστέθηκαν 1 mL επτάνιο και 1,5 mL H<sub>2</sub>O και το μείγμα αναδεύτηκε έντονα με σκοπό να εκχυλιστούν τα λιπίδια.

#### *Διαχωρισμός λιπιδίων*

Για το διαχωρισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών από τις υπόλοιπες κατηγορίες λιπιδίων του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Πρόκειται για ένα είδος χρωματογραφίας προσρόφησης, κατά την οποία ένας διαλύτης (κινητή φάση) ταξιδεύει κατά μήκος μιας λεπτής πλάκας από πορώδες υλικό. Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή της πλάκας και παρασύρεται από την κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος ταξιδεύουν κατά μήκος της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με τη συνάφειά τους προς το διαλύτη και μ' αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται.

Χρησιμοποιήθηκε πλάκα από σίλικα της εταιρείας Sigma. Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα των λιπιδίων διαλυόταν σε 40 μL διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 (v/v) και 10 μL από αυτά ενσταλλάζονταν στην πλάκα με μικροσύριγγα. Η κινητή φάση ήταν πετρελαϊκός αιθέρας - διαιθυλαιθέρας - οξικό οξύ 120:30:1,5 (v/v/v). Η πλάκα τοποθετούνταν μέσα σε ειδικό γυάλινο δοχείο, όπου 1 h πριν είχε τοποθετηθεί η κινητή φάση και αναπτυσσόταν για περίπου 45 min. Στη συνέχεια, η πλάκα αφαιρούνταν, στέγνωσε και ψεκαζόταν με διάλυμα 0,2 % διχλωροφλουορεσεΐνης σε αιθανόλη. Με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός εντοπίζονταν οι κηλίδες των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών και αποξέονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα.

#### *Παρασκευή και διαχωρισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων*

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών έγινε μέσω της μετατροπής τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οι οποίοι μετρήθηκαν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, που περιείχε το απόξεσμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών προσθέτονταν 1 mL διαλύματος θειικού οξέος 4% σε μεθανόλη, ο σωλήνας κλεινόταν ερμητικά και το μείγμα επωαζόταν στους 64°C όλο το βράδυ. Με αυτή τη μέθοδο, οι ακυλομάδες των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών μετατρέπονταν σε μεθυλεστέρες των αντίστοιχων λιπαρών οξέων. Για την εκχύλιση των μεθυλεστέρων προσθέτονταν 1 mL πετρελαϊκού αιθέρα και 1,5 mL απεσταγμένου νερού σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα αφού είχε κρυώσει και

το μείγμα αναδευόταν για 1 min σε κυκλομείκτη. Από τις δύο σχηματιζόμενες στοιβάδες, η υπερκείμενη (που περιείχε τους μεθυλεστέρες) μεταφερόταν σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμιζόταν κάτω από ρεύμα αζώτου (χωρίς θέρμανση) για τη συμπύκνωση των μεθυλεστέρων.

Η αέρια χρωματογραφία είναι ένα είδος χρωματογραφίας κατανομής, κατά την οποία τα συστατικά ενός μείγματος κατανέμονται ανάμεσα σε μια στάσιμη και μια κινητή φάση. Η στάσιμη φάση είναι υγρή και είναι προσροφημένη επάνω στο στερεό υλικό ενός μακρού και στενού σωλήνα, που ονομάζεται στήλη αέριας χρωματογραφίας. Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα σε κλίβανο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ο οποίος είναι το κεντρικό μέρος του αέριου χρωματογράφου. Κατά μήκος της στήλης ταξιδεύει η αέρια κινητή φάση. Το δείγμα εισάγεται στην αρχή της στήλης και παρασύρεται από την κινητή φάση κατά μήκος της στάσιμης. Τα συστατικά του δείγματος, λόγω της διαφορετικής χημικής τους δομής, έχουν διαφορετική κατανομή μεταξύ κινητής και στάσιμης φάσης με αποτέλεσμα να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από τη ροή της κινητής φάσης και το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης.

Για την ανάλυση των μεθυλεστέρων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Hewlett Packard 5890 Series II (Waldbronn, Γερμανία) εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη AT-WAX μήκους 30 m από την Alltech (Deerfield, ΗΠΑ) και με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας. Η θερμοκρασία της στήλης προγραμματίστηκε να αυξάνεται από τους 160 στους 248°C με ρυθμό 4°C/min και να παραμένει στους 248°C για 10 min. Η στάσιμη φάση ήταν (50%-κυανοπροπυλο)-μεθυλοπολυσιλοξάνιο και η κινητή φάση το αδρανές αέριο ήλιο με ροή 1 mL/min (στους 160°C).

Οι συμπυκνωμένοι μεθυλεστέρες των ελεύθερων λιπαρών οξέων διαλύονταν σε 40  $\mu$ L εξανίου και των τριακυλογλυκερολών σε 180  $\mu$ L εξανίου και από αυτά εισάγονταν 3  $\mu$ L με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης. Κατά την έξοδό του από τη στήλη, κάθε μεθυλεστέρας ανιχνευόταν με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας και το παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα διοχετευόταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Εκεί μετατρεπόταν σε καμπύλη έντασης του σήματος ως προς το χρόνο εξόδου από τη στήλη, το χρωματογράφημα. Στο χρωματογράφημα κάθε μεθυλεστέρας απεικονίζεται ως μία αιχμή. Οι μεθυλεστέρες των επιμέρους λιπαρών οξέων αναγνωρίστηκαν στα χρωματογραφήματα με σύγκριση των χρόνων κατακράτησής τους με εκείνους καθαρών μεθυλεστέρων που αγοράστηκαν από τη Sigma. Η ποσότητά τους

προσδιορίστηκε με σύγκριση του εμβαδού των αιχμών τους με εκείνο του δεκαεπτανοϊκού μεθυλεστέρα (προερχόμενου από τη μεθυλίωση του εσωτερικού προτύπου) με τη βοήθεια του λογισμικού HP 3365 ChemStation της Hewlett Packard, στη βάση του ότι το εμβαδό είναι ανάλογο της μάζας κάθε μεθυλεστέρα. Οι συνολικές συγκεντρώσεις των τριακυλογλυκερολών υπολογίστηκαν ως το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ακυλομάδων τους διαιρεμένο με το 3.

## **7. Πρωτεωμική ανάλυση**

### *7.1. Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων*

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE) πρωτεϊνών συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) και της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF, isoelectric focusing) και αποτελεί έναν από τους πιο ευαίσθητους τρόπους ανάλυσης μίγματος πρωτεϊνών. Σε αυτή τη μέθοδο, αρχικά το μίγμα υφίσταται ισοηλεκτρική εστίαση σε πήκτωμα, το οποίο διαχωρίζει τα μόρια σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο, δηλαδή το pH στο οποίο το φορτίο της κάθε πρωτεΐνης είναι μηδενικό. Το pI είναι χαρακτηριστικό της κάθε πρωτεΐνης. Η ισοηλεκτρική εστίαση είναι μια διαδικασία εξισορρόπησης, κατά τη διάρκεια της οποίας με την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλού δυναμικού οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος ταινίας (strip), η οποία φέρει πήκτωμα ακρυλαμίδης διαφορετικού pH. Στο σημείο του pH της ταινίας που αντιστοιχεί στο pI της κάθε πρωτεΐνης, το ολικό φορτίο της μηδενίζεται και η πρωτεΐνη καθιλώνεται. Ακολουθεί τοποθέτηση του strip σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου ώστε να γίνει SDS-PAGE και να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες και ως προς το μοριακό τους βάρος.

Πειραματικά, την πρώτη μέρα έγινε η ενυδάτωση του δείγματος που περιείχε ποσότητα πρωτεΐνης 50  $\mu\text{g}$ . Πιο συγκεκριμένα, 25  $\mu\text{L}$  δείγματος αναμίχθηκαν με 290  $\mu\text{L}$  διαλύματος ενυδάτωσης και παγιδεύτηκαν κάτω από το strip ακρυλαμιδίου με εύρος pH 3-10 σε ειδικό σκεύος. Πάνω από αυτά προστέθηκαν 3 mL ειδικού λαδιού και έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 11-16 h, ώστε να προσκολληθούν οι πρωτεΐνες του δείγματος στο ακρυλαμίδιο. Την επόμενη μέρα το strip τοποθετήθηκε σε ειδικό πλαστικό πιατάκι, καλύφθηκε με το λάδι και μπήκε στο μηχάνημα για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ως προς το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης διαρκεί περίπου 9 h. Στη συνέχεια το strip βγήκε, επώαστηκε με δύο διαλύματα μονιμοποίησης για 10 min και τοποθετήθηκε σε συσκευή SDS-PAGE 10% για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ως προς το μοριακό τους βάρος. Μετά από 6

η περίπου ολοκληρώνεται και η δεύτερη διάσταση και το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διαλύματα 50% μεθανόλης και 5% οξικού οξέος για μονιμοποίηση και έμεινε σε νερό όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα βάφτηκε με νιτρικό άργυρο για να φανούν οι πρωτεϊνικές κηλίδες.

## 7.2. Φασματοσκοπία μάζας

Όταν τελειώσει η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση, αξιολογηθούν τα αποτελέσματα και επιλεγούν οι πρωτεΐνες που ενδιαφέρουν, αυτές αποκόπτονται και τοποθετούνται σε φασματογράφο μάζας ώστε να ταυτοποιηθούν. Η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, την εύρεση της αμινοξικής τους αλληλουχίας και των μετα-μεταφραστικών τους τροποποιήσεων. Πριν την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, οι κηλίδες των πρωτεϊνών αποκόπηκαν μηχανικά από το πήκτωμα, ακολούθησε ο αποχρωματισμός τους, επώαση με την πρωτεάση υψηλής καθαρότητας και εξειδίκευσης τρυψίνη και εκχύλιση των παραγόμενων πεπτιδίων από τα αποκοπέντα τμήματα του πηκτώματος. Η φασματοσκοπία μάζας περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο τον ιονισμό των πεπτιδίων, την απελευθέρωσή τους στην αέρια φάση και στη συνέχεια τη μέτρηση της μάζας τους. Ο ιονισμός των πεπτιδίων και η απελευθέρωση των ιονισμένων αυτών μορίων στην αέρια φάση μπορεί να επιτευχθεί συνήθως με τις ακόλουθες μεθοδολογίες: α) Εκρόφηση-ιονισμός από μήτρα μέσω λέιζερ (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization, MALDI) και β) Ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI). Στη συνέχεια η μέτρηση της μάζας των πεπτιδίων επιτυγχάνεται με: α) μέτρηση του χρόνου πτήσης τους (time of flight, TOF), β) παγίδα ιόντων (Ion Trap, IT) και γ) χρήση τετράπολων (Graves & Haystead, 2002). Χρησιμοποιώντας συνδυαστικά τις παραπάνω μεθοδολογίες, ο προσδιορισμός της μάζας των πεπτιδίων έγινε με βάση το χρόνο της πτήσέως τους σε κατάλληλους σωλήνες υψηλού κενού, ενώ περαιτέρω ανάλυση με τους φασματογράφους μάζας περιελάμβανε την ανάλυση της αλληλουχίας των πεπτιδίων αυτών μετά τη θραύση τους σε αμινοξέα (Graves & Haystead, 2002). Η πλήρης ταυτοποίηση της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και τη διερεύνηση σχετικών πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων.

## **8. Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα των ενζύμων XO, CAT και SOD.**

Η επίδραση των εκχυλισμάτων σταφυλιών στην ενζυμική δραστικότητα των XO, CAT και SOD έγινε στη συγκέντρωση των υποστρωμάτων, όπου τα ένζυμα αρχίζουν να βρίσκονται σε κορεσμό, αρχίζουν δηλαδή να δρουν με τη μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων, όπου τα ένζυμα δρουν με τη μέγιστη ταχύτητα προσδιορίστηκε η καμπύλη ταχύτητας-ενζύμου  $[V]$  και συγκέντρωσης υποστρώματος  $[S]$ . Η σχέση ταχύτητας-συγκέντρωσης υποστρώματος ακολουθούσε το πρότυπο Michaelis-Menten και η μεταβολή της απορρόφησης/λεπτό υπολογίστηκε στο γραμμικό κομμάτι των αντιδράσεων. Η XO αποκτήθηκε από το εμπόριο ενώ ως πηγή της CAT και της SOD χρησιμοποιήθηκε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα που λήφθηκε από τη φλέβα υγιούς δότη ηλικίας 28 ετών, ο οποίος βρισκόταν σε κατάσταση ηρεμίας. Τα εκχυλίσματα σταφυλιών που χρησιμοποιήθηκαν και η πολυφαινολική τους σύσταση φαίνονται στο παράρτημα (Πίνακες 11 και 12).

### **8.1. Πρωτόκολο προσδιορισμού της δραστικότητας της XO**

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 323  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 33 mM και 0,1 mM EDTA (pH 7,5), 80  $\mu\text{L}$  διαλύματος ξανθίνης συγκέντρωσης 4,8  $\mu\text{M}$  (στην οποία το ένζυμο αρχίζει να δρα με τη  $V_{max}$ ) και 80  $\mu\text{L}$  από το προς μελέτη εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα μόνο με την ξανθίνη και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν ο αρνητικός μάρτυρας. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 43 munit XO και η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης μετρήθηκε στα 295 nm για 4 min. Η αλοπουρινόλη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ανασταλτικής δράσης. Η ταχύτητα της δράσης της XO υπολογίστηκε με βάση το συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του ουρικού οξέος ( $9600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) στα 295 nm. Η ταχύτητα της XO υπολογίστηκε με τον τύπο:  $V$  ( $\mu\text{mol}$  ουρικού οξέος/min) =  $[(\Delta\text{abs}/\text{min} \times 500)/9600]$ .

### **8.2. Πρωτόκολο προσδιορισμού της δραστικότητας της CAT**

Στην αντίδραση προστέθηκαν 2886  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 67 mM (pH 7,4), 4  $\mu\text{L}$  ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (αραιωμένου 1:40 v/v) και 100  $\mu\text{L}$  του προς μελέτη εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα μόνο με το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν ο

αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα αναδεύονταν και επωάζονταν για 10 min στους 37°C, στη συνέχεια προστίθονταν 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  συγκέντρωσης 30 mM (στην οποία το ένζυμο αρχίζει να δρα με τη  $V_{\text{max}}$ ) και η μεταβολή της απορρόφησης μετρήθηκε στα 240 nm για 2 min. Το αζίδιο του νατρίου χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ως γνωστός αναστολέας του ενζύμου (Keilin & Hartree, 1934). Η ταχύτητα της δράσης της CAT υπολογίστηκε με βάση το συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $40\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) στα 240 nm. Η ταχύτητα της CAT υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$V (\text{mmol } \text{H}_2\text{O}_2/\text{min}) = [(\Delta\text{abs}/\text{min} \times 3)/40]$$

### 8.3. Πρωτόκολλο προσδιορισμού της δραστικότητας της SOD

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dieterich et al. (2000). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης,  $\text{C}_6\text{H}_5(\text{OH})_3$ , η οποία είναι αποτέλεσμα της δράσης των  $\text{O}_2^{\cdot-}$  της ατμόσφαιρας (Gao et al., 1998). Στην αντίδραση προστέθηκαν 770  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 0,05mM και DTPA συγκέντρωσης 1 mM (pH 8,2), 30  $\mu\text{L}$  ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (αραιωμένου 1:10 v/v) και 100  $\mu\text{L}$  από το προς μελέτη εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα μόνο με το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν ο αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα αναδεύονταν και επωάζονταν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος πυρογαλλόλης συγκέντρωσης 0,8 mM (στην οποία το ένζυμο αρχίζει να δρα με τη  $V_{\text{max}}$ ) και η μεταβολή στην οπτική απορρόφηση μετρούνταν στα 420 nm για 3 min.

Επειδή τα φυτικά εκχυλίσματα αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες εξετάστηκε η ικανότητά τους να οξειδώνουν την πυρογαλλόλη απουσία του ενζύμου. Για την αντίδραση αυτή προστέθηκαν 800 $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 0,05 mM και DTPA 1 mM (pH 8,2) και 100  $\mu\text{L}$  από το προς μελέτη εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινούσε μετά την προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος πυρογαλλόλης συγκέντρωσης 0,8 mM και η μεταβολή της απορρόφησης όπως παραπάνω. Η ταχύτητα δράσης της SOD υπολογίστηκε με βάση το συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας της πυρογαλλόλης ( $2,47\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) στα 420 nm. Η ταχύτητα της SOD εκφράζεται ως mmol πυρογαλλόλης που αυτοοξειδώνονται παρουσία του ενζύμου ανά min και υπολογίστηκε με τον τύπο:  $V (\text{mmol πυρογαλλόλης}/\text{min}) = [(\Delta\text{abs}/\text{min} \times 1)/2470]$



Για τα εκχυλίσματα προσδιορίστηκαν οι τιμές  $IC_{50}$  (συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%) και  $PC_{50}$  (συγκέντρωση του ενεργοποιητή που προκαλεί αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%). Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν ενώ οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρέαζαν τη δραστηριότητα των ενζύμων.

## **9. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης για έρευνες κοινωνικών επιστημών (Statistical Package for Social Sciences, SPSS version 13,0). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι περιγραφικής στατιστικής, δηλαδή υπολογίστηκαν ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) και το τυπικό σφάλμα του μέσου (standard error of the mean, SEM).

Ακολούθησαν μέθοδοι επαγωγικής στατιστικής. Πρώτα έγινε ο έλεγχος της κανονικότητας των κατανομών των εξεταζόμενων (εξαρτημένων) μεταβλητών, που αποτελεί τη βασική παραδοχή για την αξιόπιστη χρήση παραμετρικών μεθόδων στατιστικής ανάλυσης, με τη χρήση του κριτηρίου Kolmogorov-Smirnov.

Κατόπιν, για το πείραμα της χορήγησης αλοπουρινόλης αξιολογήθηκαν οι διαφορές των εξαρτημένων μεταβλητών ανάμεσα στις 3 πειραματικές ομάδες (άσκηση, χορήγηση αλοπουρινόλης και ο συνδυασμός τους). Η αξιολόγηση αυτή έγινε μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση  $\times$  χρόνος) (two-way ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης απλής κύριας επίδρασης.

Τα δεδομένα για την απόδοση και τα δεδομένα από την ανάλυση western για τη διμερή αλβουμίνη αναλύθηκαν με Student's *t*-test για ανεξάρτητα δείγματα. Για τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των δεικτών οξειδωτικού στρες αμέσως μετά την άσκηση και της απόδοσης χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης κατά Spearman.

Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης των τιμών των δεικτών οξειδωτικού στρες μεταξύ αίματος και ιστών χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης κατά Spearman. Με τη χρήση του τεστ Shapiro-Wilk βρέθηκε ότι οι τιμές των δεικτών που μελετήθηκαν διέφεραν από την κανονική κατανομή. Για τη συγκεκριμένη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Statistica 7.

Σχετικά με το πείραμα της χορήγησης εκχυλίσματος, η αξιολόγηση των διαφορών των εξαρτημένων μεταβλητών ανάμεσα στις 2 πειραματικές ομάδες (χορήγηση φυσιολογικού ορού και χορήγηση εκχυλίσματος) έγινε μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση  $\times$  χρόνος) (two-way ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν με Bonferroni *t*-test.. Τα δεδομένα για την απόδοση αναλύθηκαν με Student's *t*-test για ανεξάρτητα δείγματα.

Όσον αφορά στη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων σταφυλιών στα ένζυμα που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, η αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών έγινε με one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett.

Στη στατιστική ανάλυση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0,05$ .

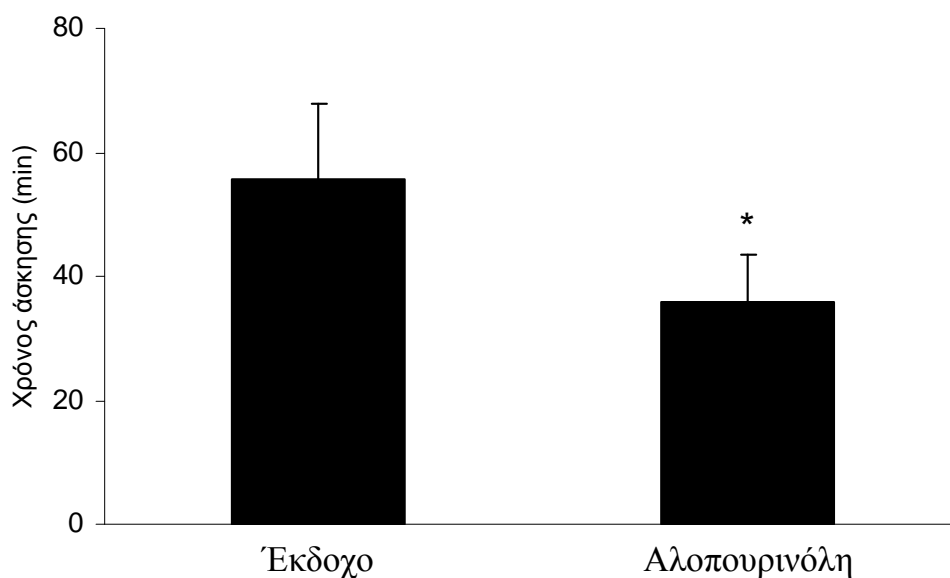
## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



## **1. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ** **ΑΣΚΗΣΗ**

### ***1.1. Η επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης στην απόδοση των επιμύων***

Η απόδοση μετρήθηκε σε 40 επίμυες, στους μισούς εκ των οποίων χορηγήθηκε DMSO και στους άλλους μισούς αλοπουρινόλη. Στους επίμυες της πρώτης ομάδας η εξάντληση επήρθε μετά από  $56 \pm 8$  min ενώ στους επίμυες της δεύτερης ομάδας επήρθε μετά από  $36 \pm 5$  min. Οι επίμυες, δηλαδή, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη κολύπησαν κατά 35% λιγότερο ( $P = 0,012$ ) σε σχέση με τους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO (Εικόνα 18).



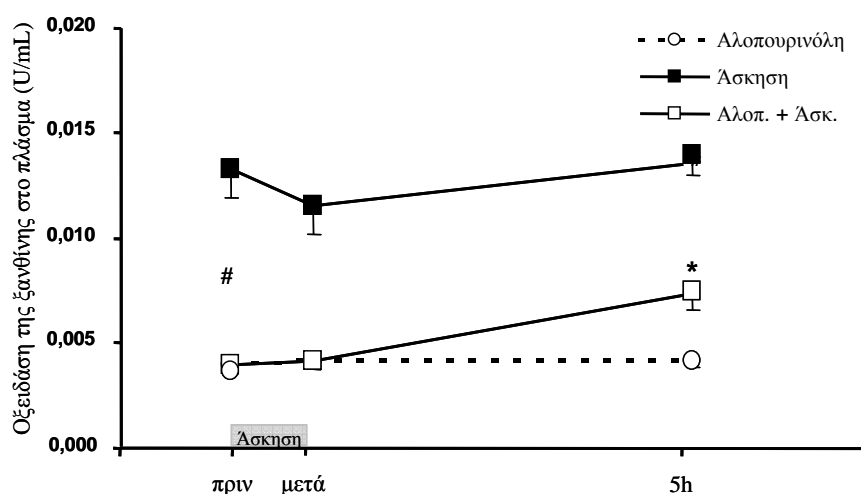
**Εικόνα 18.** Η επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης στην απόδοση των επιμύων.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή στην ομάδα που χορηγήθηκε DMSO ( $P < 0,05$ ).

## 1.2. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στο αίμα των επιμύων

### Οξείδωση της ξανθίνης

Στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,001$ ) και του χρόνου ( $P < 0,05$ ). Όπως αναμενόταν, η δραστηριότητα της XO ανεστάλη στην ηρεμία 1,5 h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η δραστηριότητα της XO αυξήθηκε 5 h μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη (Εικόνα 19).

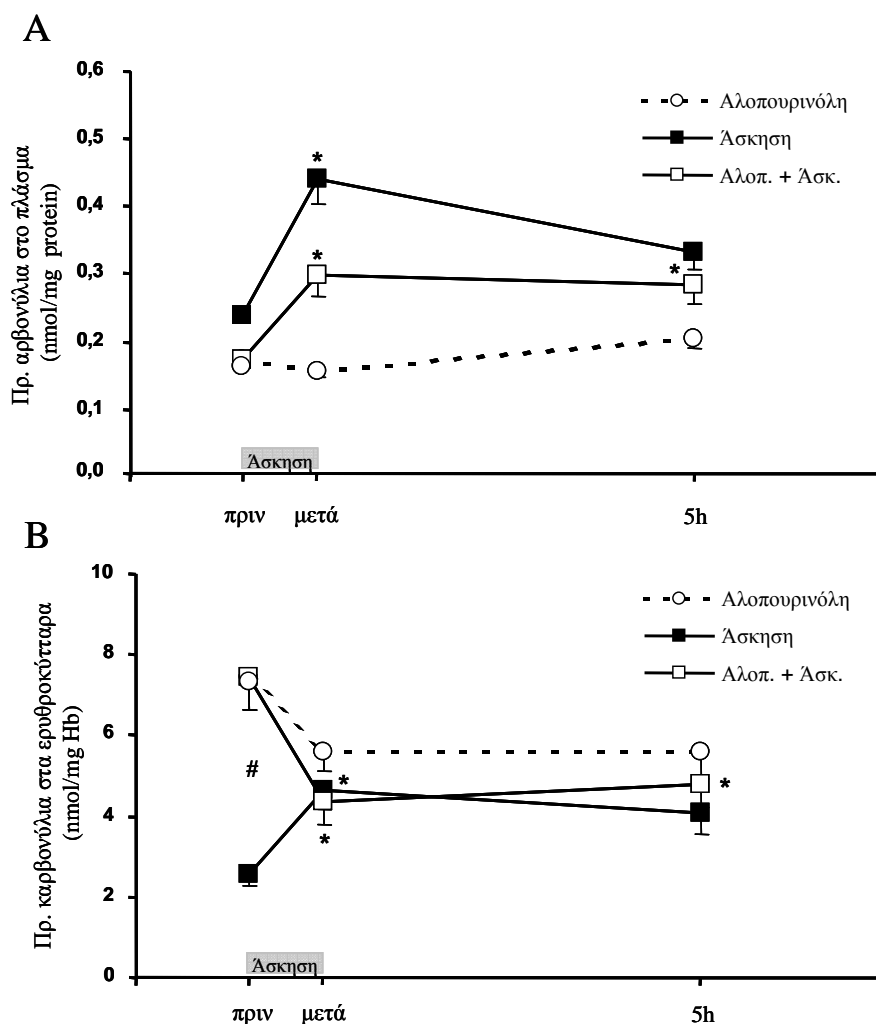


**Εικόνα 19.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξείδωσης της ξανθίνης στο πλάσμα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

### Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ) (Εικόνα 20Α). Στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και σημαντική επίδραση του συνδυασμού παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ) (Εικόνα 20Β). Στα ερυθροκύτταρα η αλοπουρινόλη προκάλεσε πρωτεϊνική οξείδωση στην ηρεμία, όπως φάνηκε από την αυξημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων 1,5 h μετά τη χορήγηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα, ενώ η αλοπουρινόλη περιορίσε αυτή την αύξηση στο πλάσμα. Σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική δράση

της αλοπουρινόλης στο πλάσμα, στα ερυθροκύτταρα προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε μεγαλύτερη έκταση σχετικά με την άσκηση ή το συνδυασμό τους.

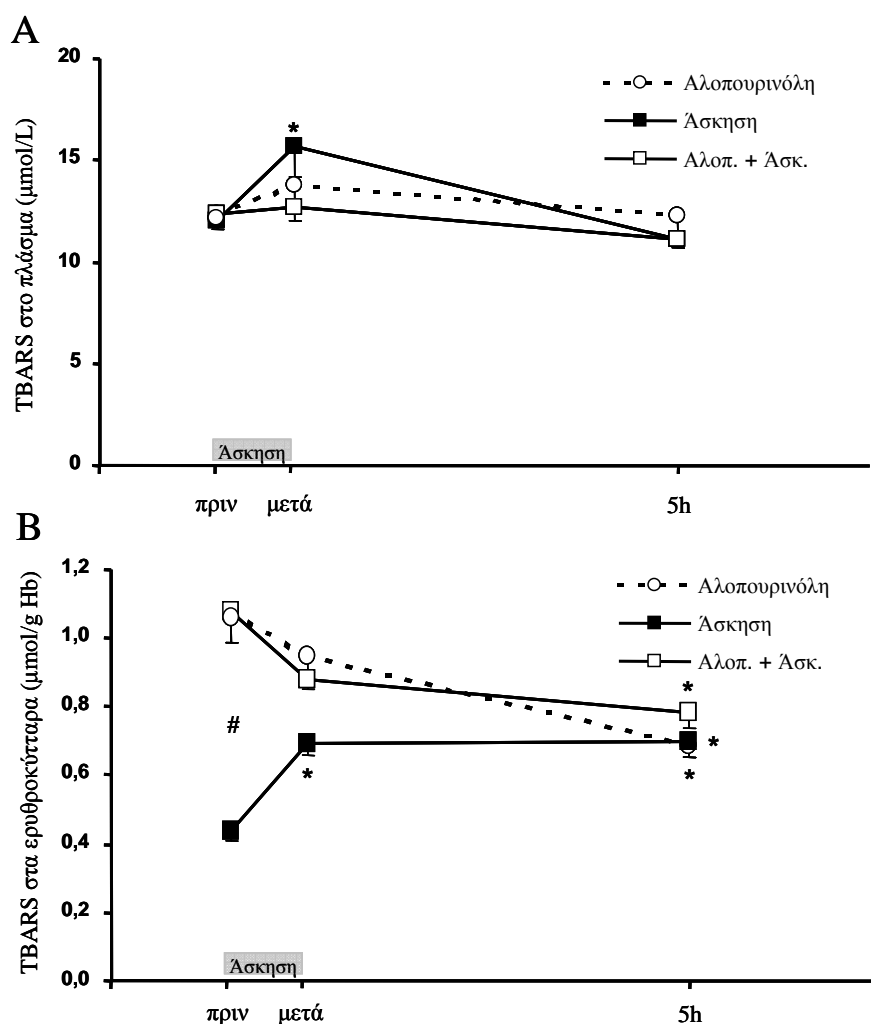


**Εικόνα 20.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα (A) και τα ερυθροκύτταρα (B). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

### TBARS

Στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου ( $P < 0,001$ ) (Εικόνα 21A). Στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ) (Εικόνα 21B). Όπως και στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, στα ερυθροκύτταρα η αλοπουρινόλη προκάλεσε λιπιδική υπεροξείδωση στην ηρεμία, όπως φάνηκε από την αυξημένη συγκέντρωση

των TBARS 1,5 h μετά τη χορήγηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η συγκέντρωση των TBARS στο πλάσμα αυξήθηκε αμέσως μετά την άσκηση ενώ η αλοπουρινόλη δεν περιορίσε αυτή την αύξηση. Η άσκηση αύξησε, επίσης, τη συγκέντρωση των TBARS στα ερυθροκύτταρα.

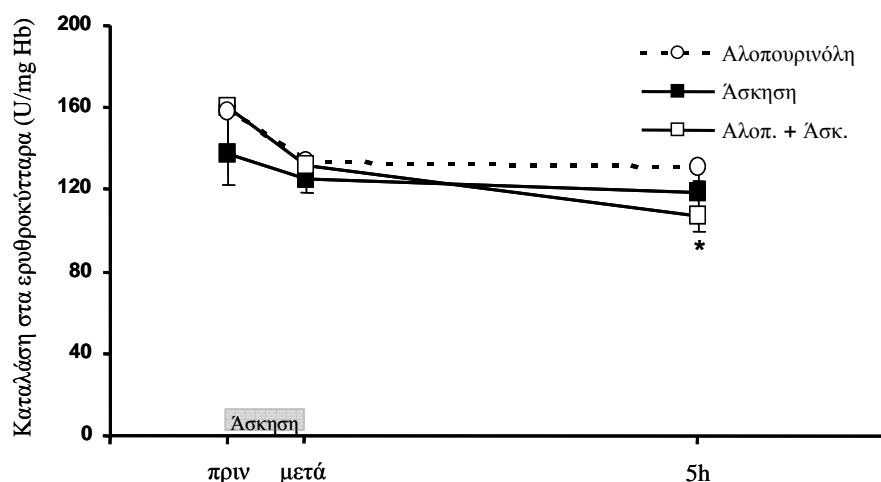


**Εικόνα 21.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο πλάσμα (Α) και τα ερυθροκύτταρα (Β). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).



## Καταλάση

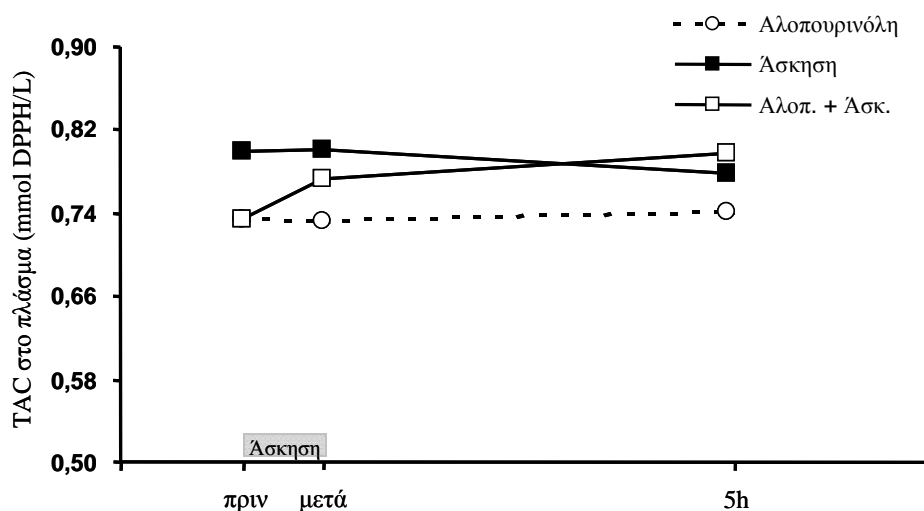
Στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η δραστηριότητα της καταλάσης μειώθηκε 5 h μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 22).



**Εικόνα 22.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ).

## TAC

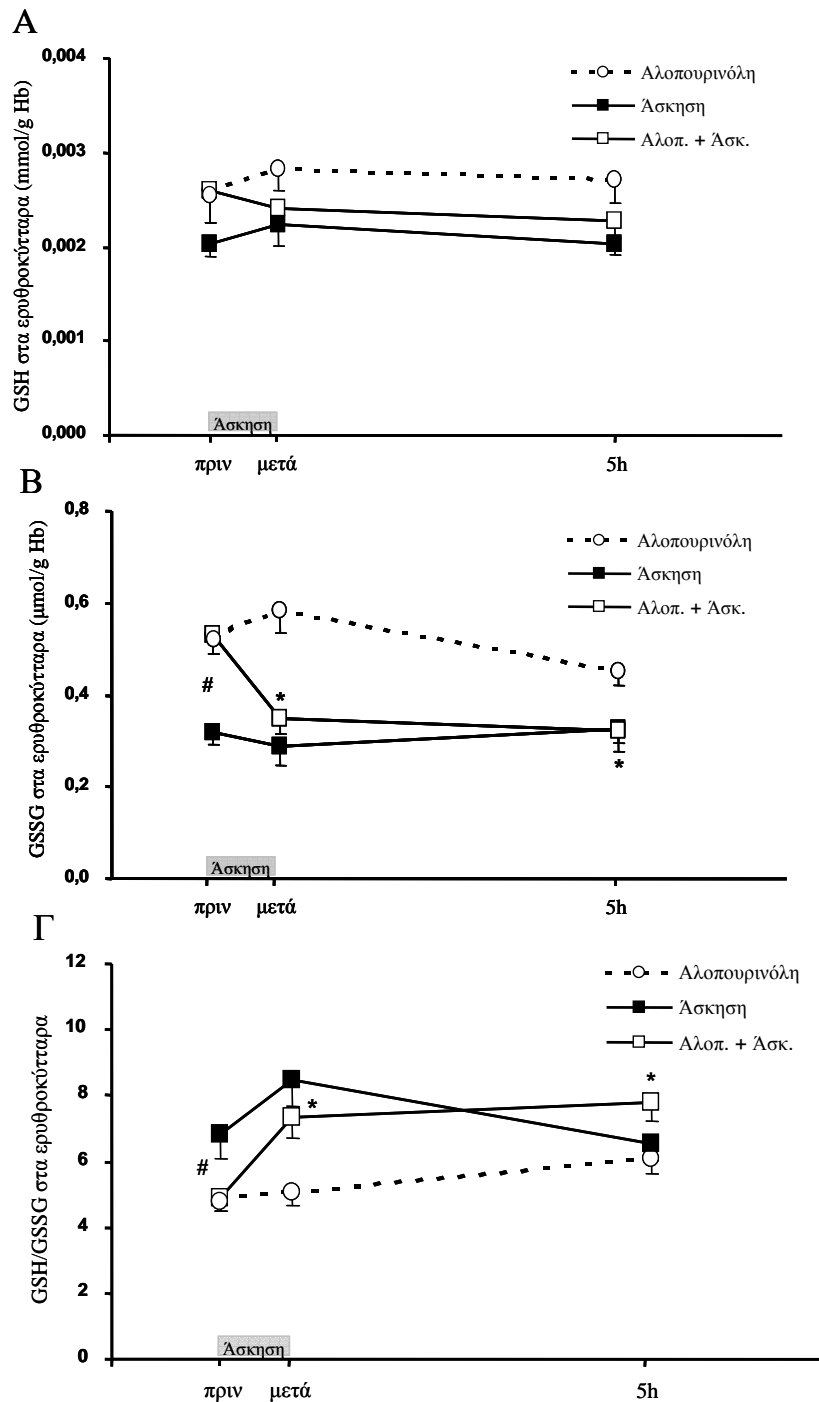
Στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,05$ ). Η χορήγηση αλοπουρινόλης μείωσε την TAC στην ηρεμία συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ενώ η άσκηση δεν την επηρέασε (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην TAC στο πλάσμα.

### *GSH, GSSG και GSH/GSSG*

Για την GSH στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,01$ ). Οι ασκηθέντες επίμυες είχαν μειωμένη συγκέντρωση της GSH συγκριτικά με εκείνους, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη χωρίς να κάνουν άσκηση (Εικόνα 24A). Για την GSSG στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,001$ ), του χρόνου ( $P < 0,05$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,01$ ). Η χορήγηση αλοπουρινόλης αύξησε τη συγκέντρωση της GSSG ενώ η άσκηση δεν την επηρέασε (Εικόνα 24B). Για το λόγο GSH/GSSG στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,01$ ), του χρόνου ( $P < 0,001$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ). Η αλοπουρινόλη μείωσε το λόγο GSH/GSSG στην ηρεμία 1,5 h μετά τη χορήγηση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Στις ίδιες χρονικές στιγμές, ο λόγος GSH:GSSG αυξήθηκε στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και έκαναν άσκηση (Εικόνα 24Γ).

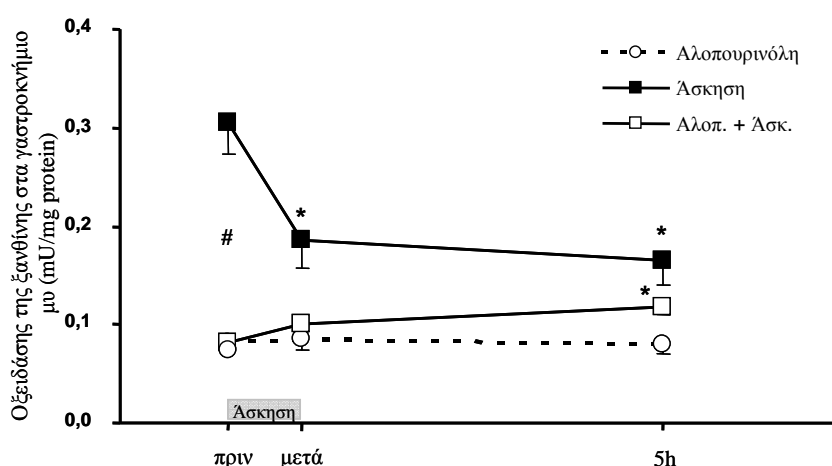


**Εικόνα 24.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (A), της GSSG (B) και του λόγου GSH/GSSG στα ερυθροκύτταρα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

### 1.3. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στο γαστροκνήμιο μυ των επιμύων

#### Οξείδωση της ξανθίνης

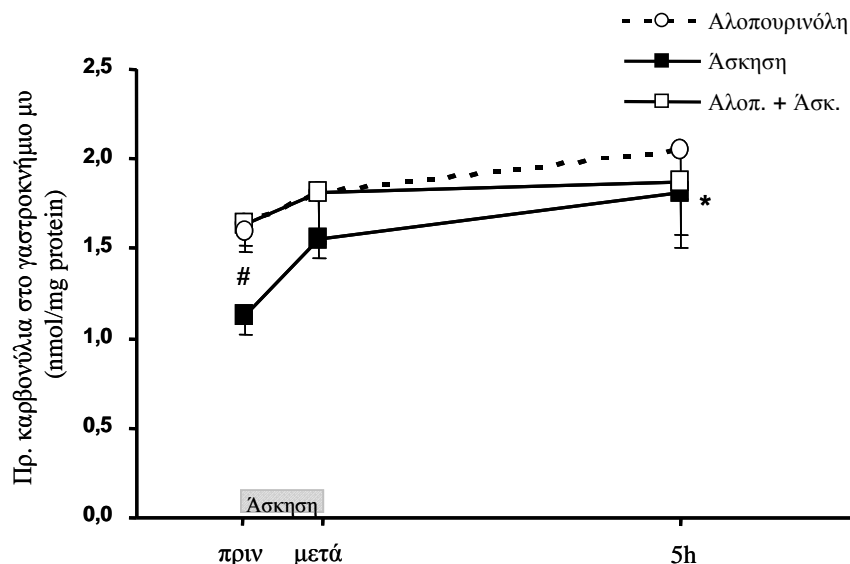
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,001$ ) και του χρόνου ( $P < 0,05$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ). Όπως αναμενόταν, η δραστηριότητα της οξείδωσης ανεστάλη στην ηρεμία 1,5 h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ μειώθηκε αμέσως μετά και 5h ώρες μετά την άσκηση (Εικόνα 25).



**Εικόνα 25.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξείδωσης της ξανθίνης στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

#### Πρωτεϊνικά καρβονύλια

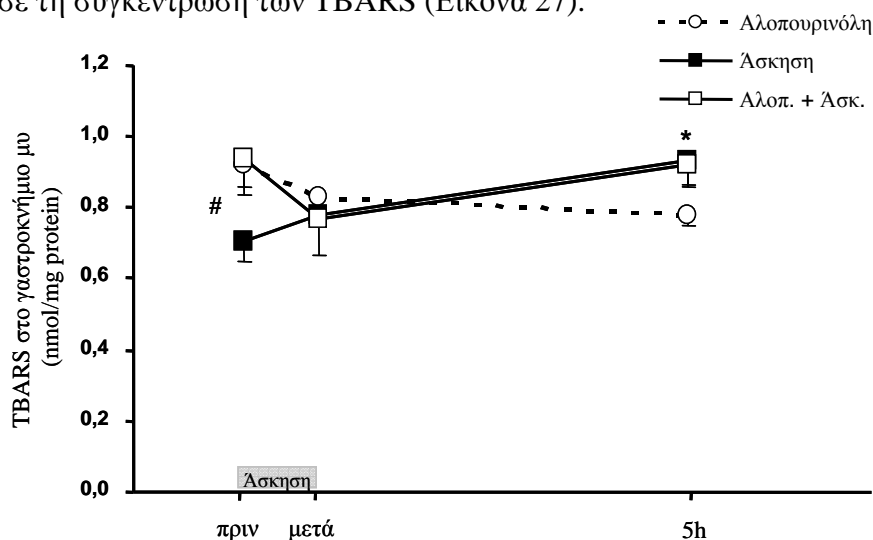
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η αλοπουρινόλη προκάλεσε πρωτεϊνική οξείδωση στην ηρεμία, όπως φάνηκε από την αυξημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων 1,5 h μετά τη χορήγηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Εικόνα 26).



**Εικόνα 26.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

#### TBARS

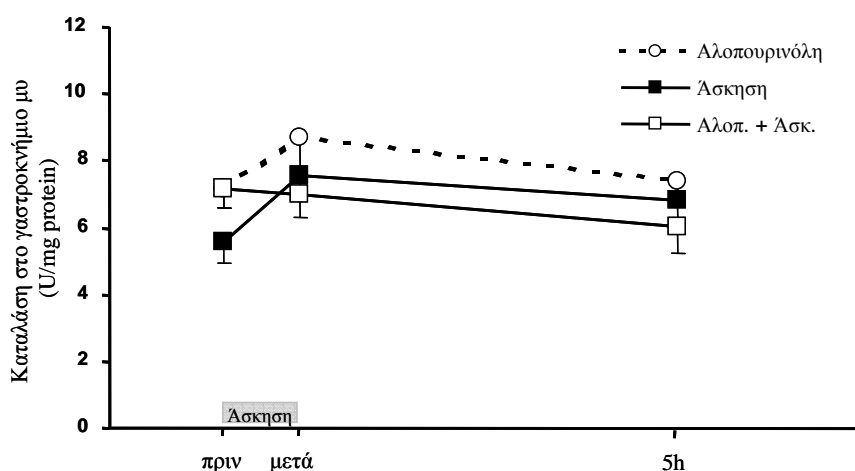
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η αλοπουρινόλη προκάλεσε λιπιδική υπεροξείδωση στην ηρεμία, όπως φάνηκε από την αυξημένη συγκέντρωση των TBARS 1,5 h μετά τη χορήγηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ενώ άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS (Εικόνα 27).



**Εικόνα 27.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

## Καταλάση

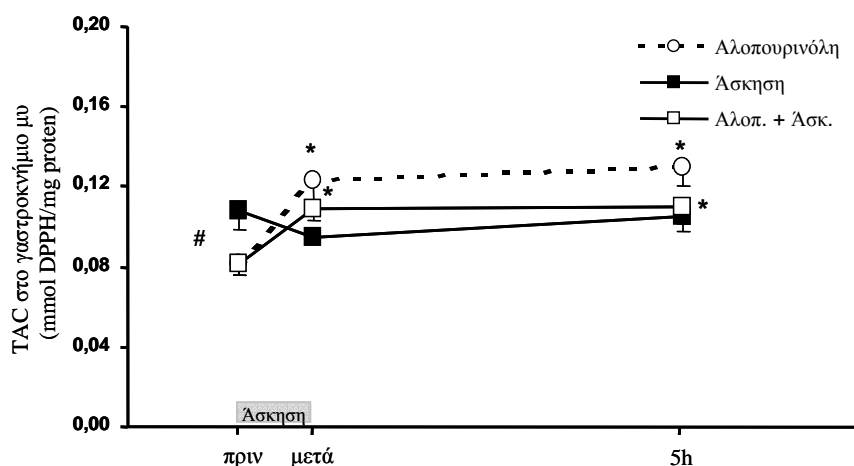
Δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 28).



**Εικόνα 28.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ.

## TAC

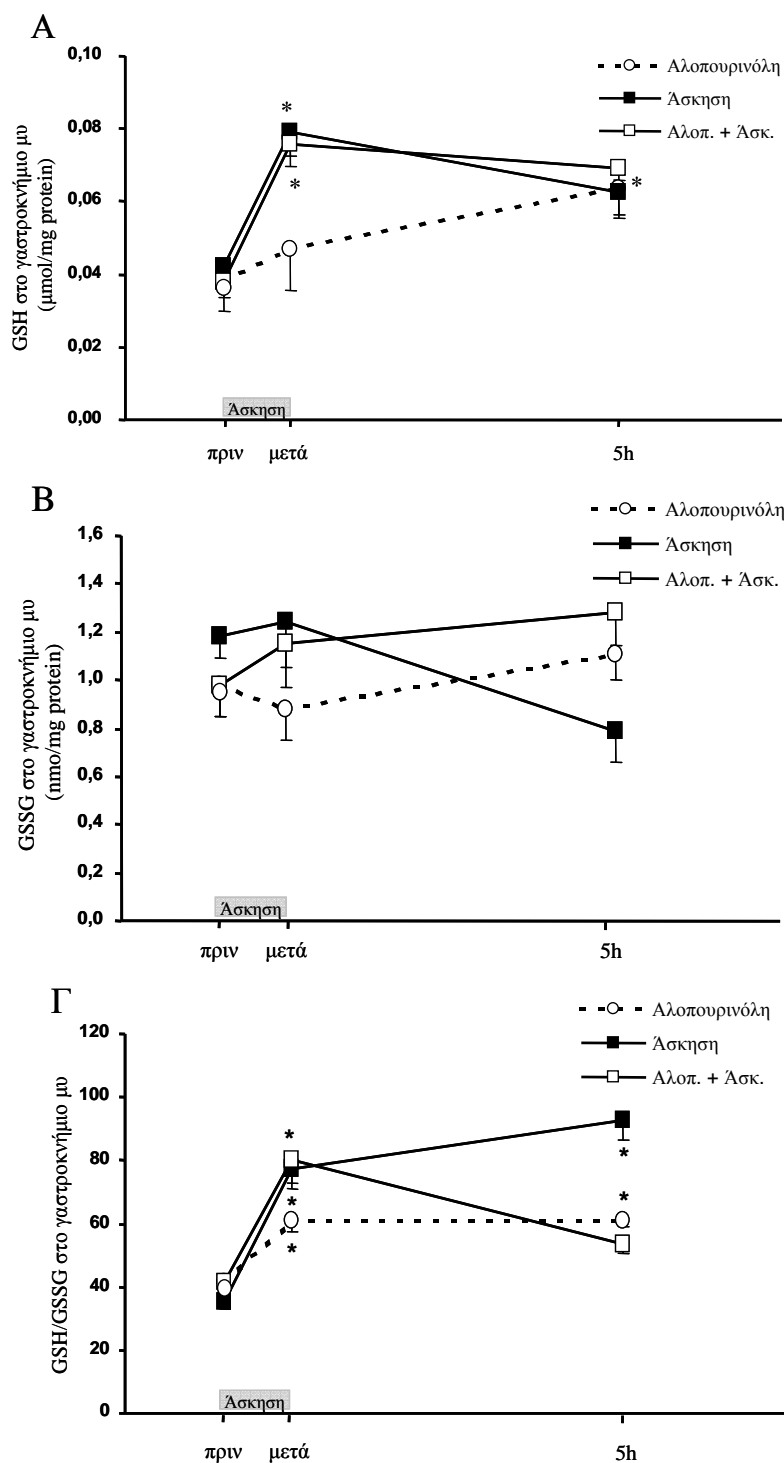
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου ( $P < 0,001$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ). Η αλοπουρινόλη αύξησε την TAC αμέσως μετά και 5 h μετά τη χορήγηση, ενώ η άσκηση δεν την επηρέασε (Εικόνα 29).



**Εικόνα 29.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην TAC στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

### *GSH, GSSG & GSH/GSSG*

Για την GSH βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,05$ ), του χρόνου ( $P < 0,001$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η συγκέντρωση της GSH στους ασκηθέντες επίμυες ήταν μεγαλύτερη αμέσως μετά την άσκηση συγκριτικά με τους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και δεν ασκήθηκαν (Εικόνα 30Α). Για την GSSG βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Για το λόγο GSH/GSSG βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,01$ ), του χρόνου ( $P < 0,001$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ) (Εικόνα 30Β). Ο λόγος GSH/GSSG αυξήθηκε αμέσως μετά και 5 h μετά την άσκηση σε σύγκριση με τα επίπεδα του λόγου πριν άσκηση. Στις ίδιες χρονικές στιγμές, ο λόγος GSH:GSSG αυξήθηκε στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και έκαναν άσκηση (Εικόνα 30Γ).



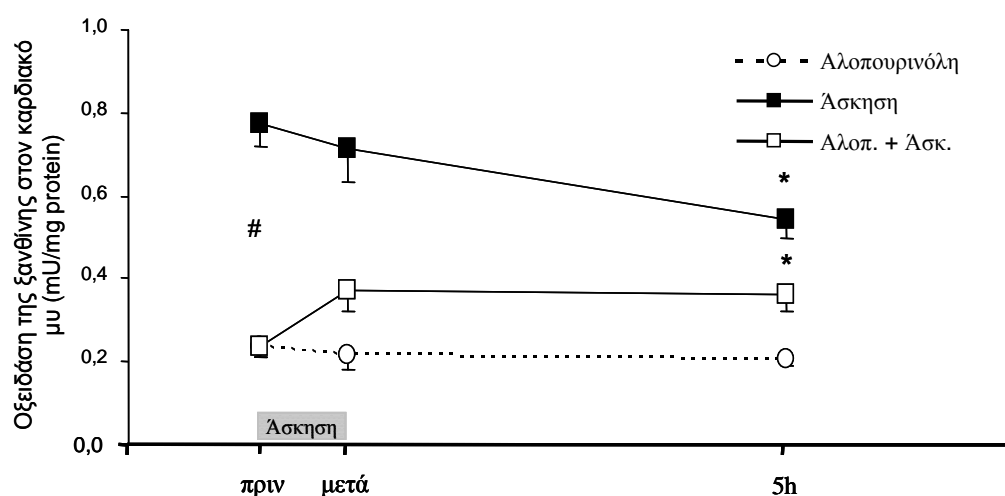
**Εικόνα 30.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (A), της GSSG (B) και του λόγου GSH/GSSG στο γαστροκνήμιο μν. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ).



#### 1.4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στον καρδιακό μυ των επιμύων

##### Οξειδάση της ξανθίνης

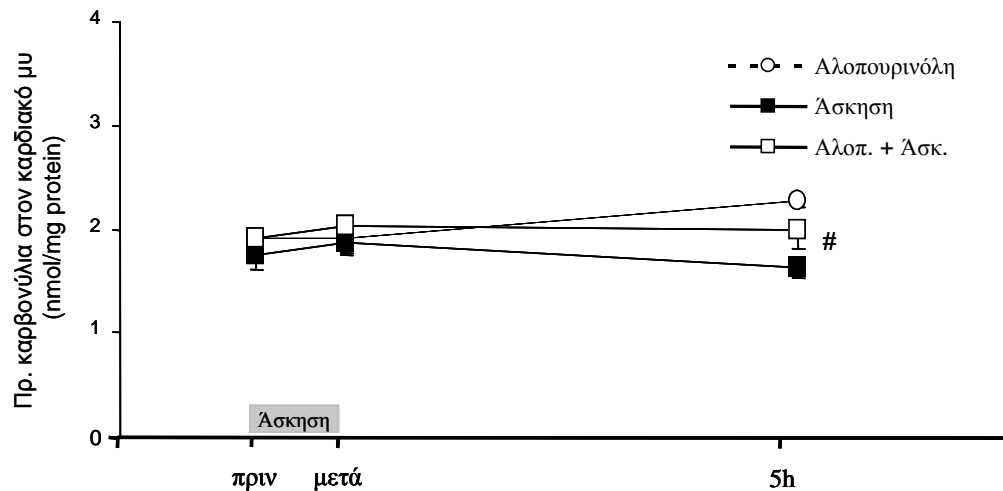
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η αλοπουρινόλη μείωσε κατά 4 περίπου φορές τη δραστικότητα της XO. Η δραστικότητά της μειώθηκε 5 h μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και αυξήθηκε 5 h μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη (Εικόνα 31).



**Εικόνα 31.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στον καρδιακό μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

### Πρωτεϊνικά καρβονύλια

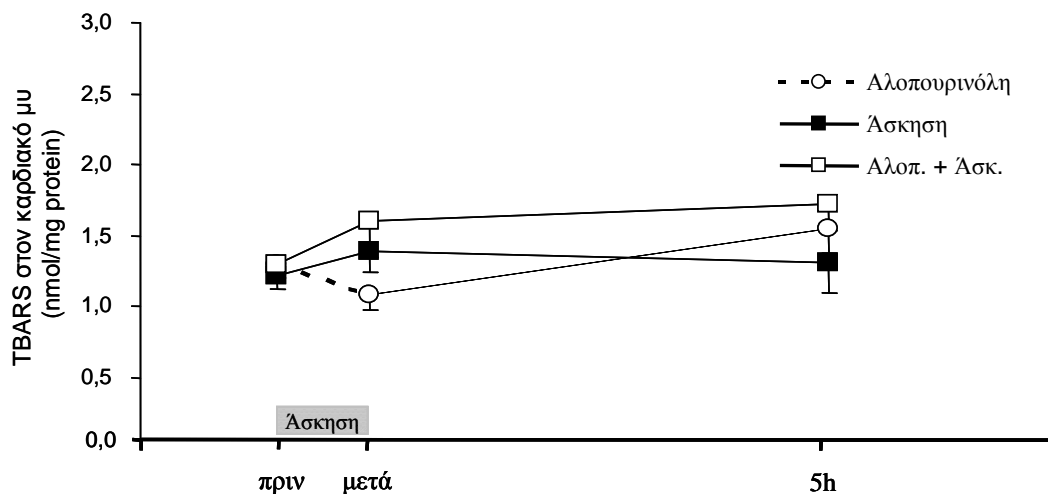
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,05$ ). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν αυξημένη 7,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης σε σχέση με τους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και ασκήθηκαν (Εικόνα 32).



**Εικόνα 32.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό μυ. # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

### TBARS

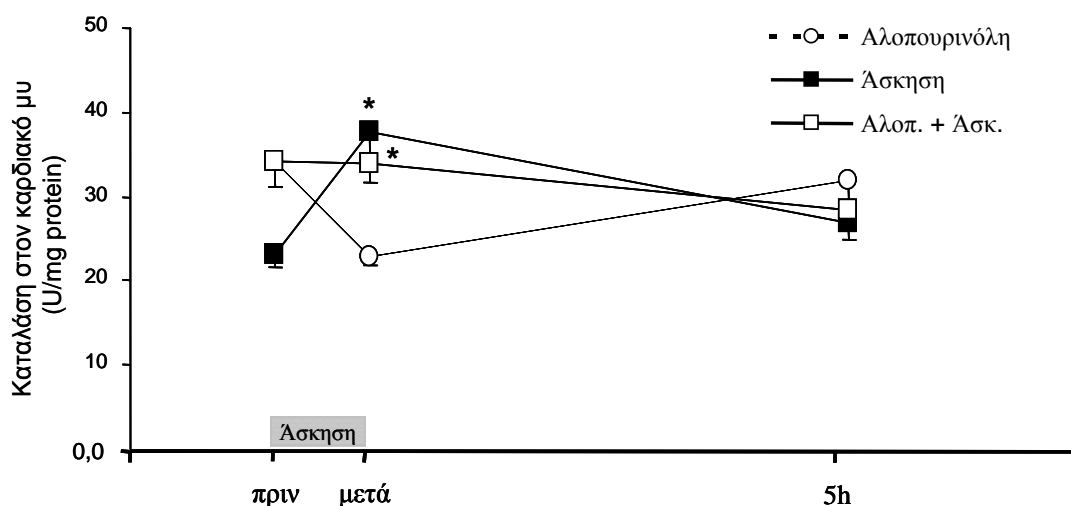
Δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 33).



**Εικόνα 33.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στον καρδιακό μυ.

## Καταλάση

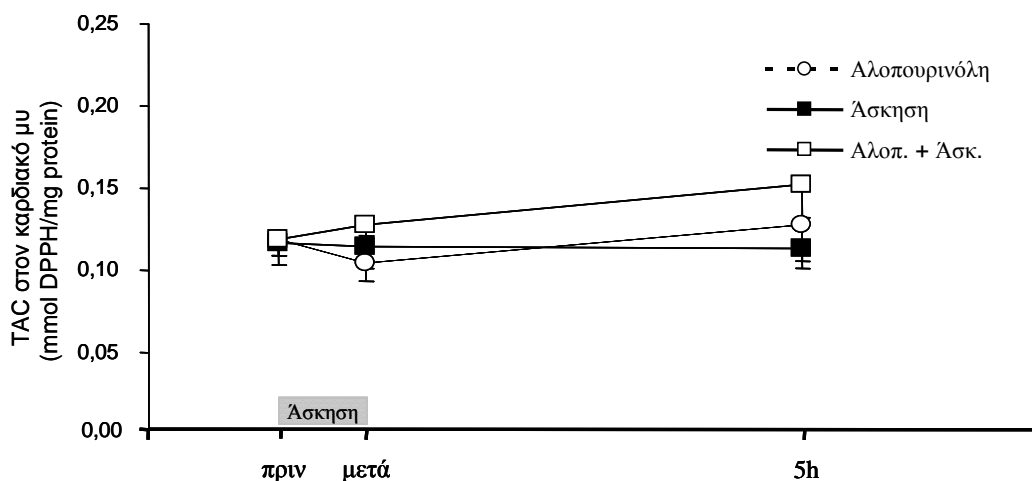
Βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η άσκηση αύξησε τη δραστικότητα της καταλάσης και η χορήγηση αλοπουρινόλης τη μείωσε (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στον καρδιακό μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ).

## TAC

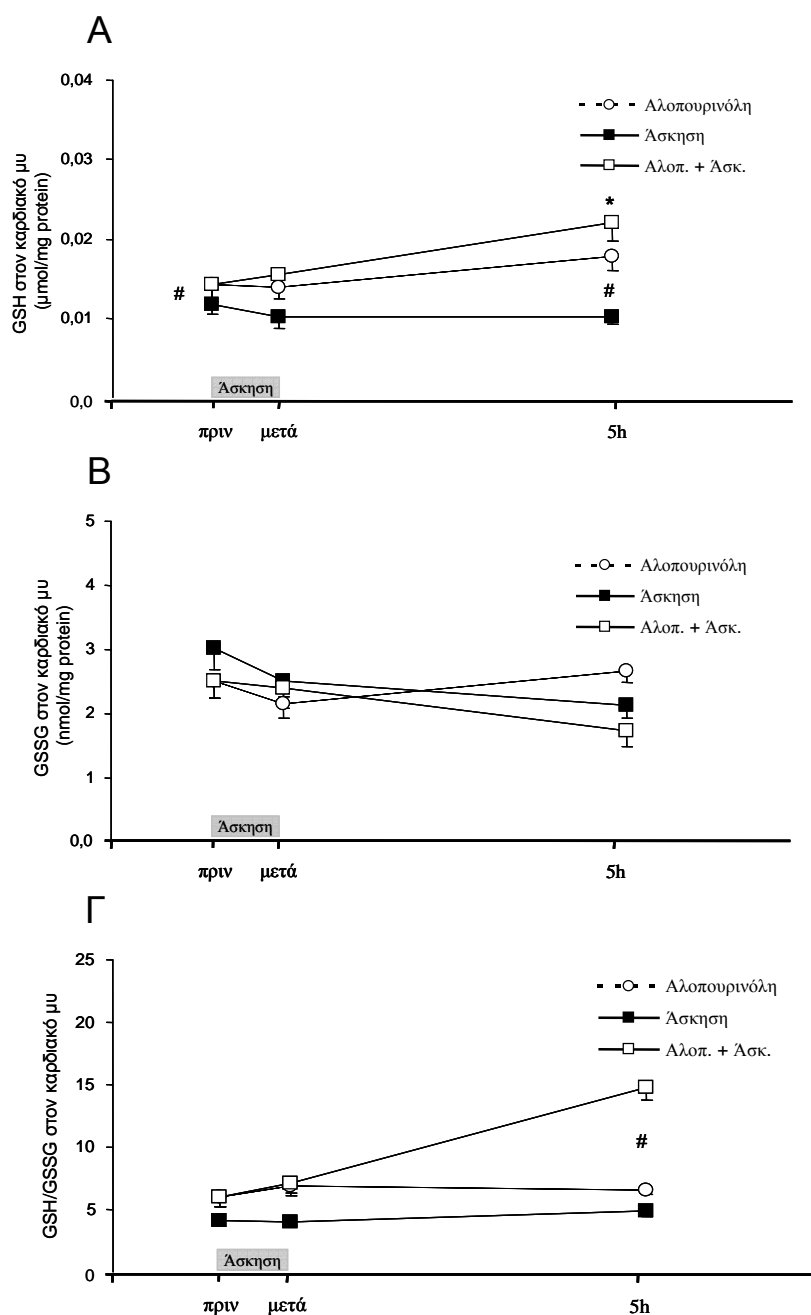
Δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 35).



**Εικόνα 35.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στον καρδιακό μυ.

### *GSH, GSSG και GSH/GSSG*

Για την GSH βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η χορήγηση αλοπουρινόλης και ο συνδυασμός άσκησης και χορήγησης αλοπουρινόλης αύξησαν τη συγκέντρωση της GSH (Εικόνα 36Α). Στην GSSG δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 36Β). Για το λόγο GSH/GSSG βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Ο συνδυασμός της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης αύξησαν το λόγο GSH/GSSG (Εικόνα 36Γ).

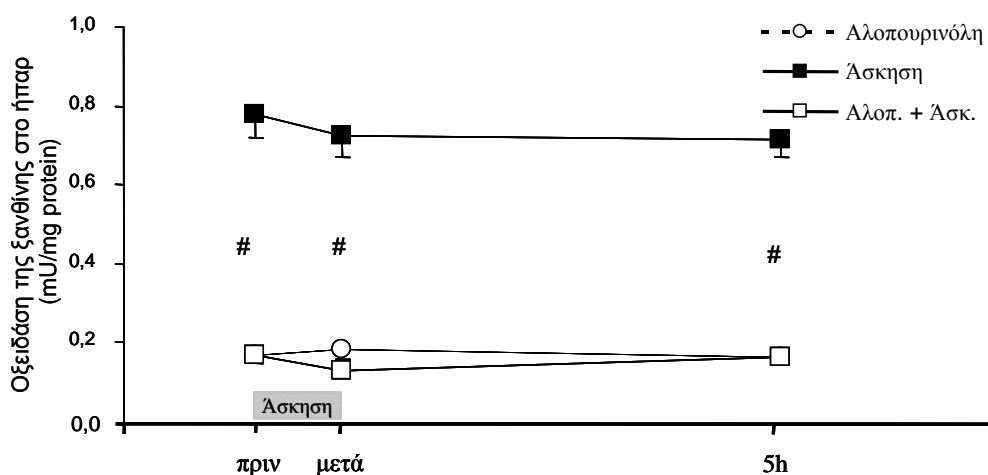


**Εικόνα 36.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (Α), της GSSG (Β) και του λόγου GSH/GSSG (Γ) στον καρδιακό μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0.05$ ).

### 1.5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες στο ήπαρ των επιμύων

#### Οξειδάση της ξανθίνης

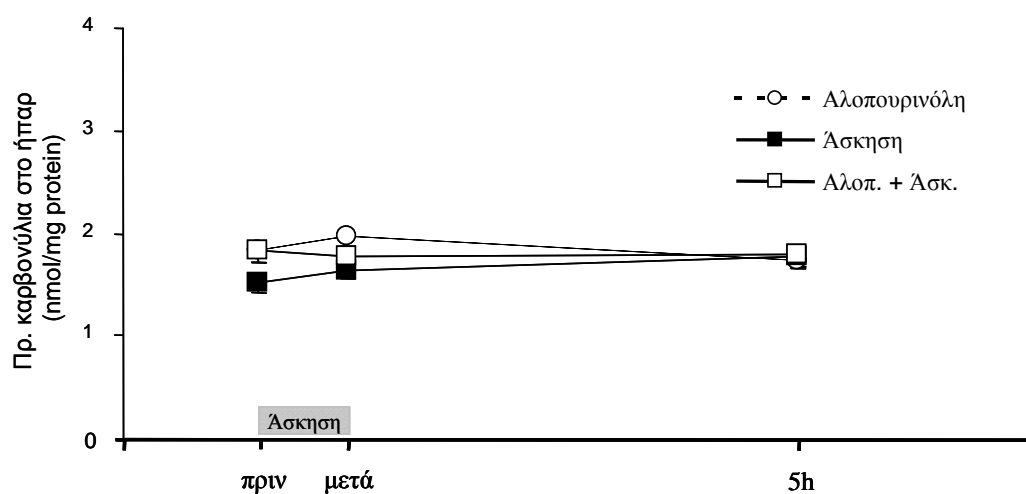
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0.05$ ). Η αλοπουρινόλη και ο συνδυασμός της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης μείωσαν κατά 4 περίπου φορές τη δραστηριότητα της XO (Εικόνα 37).



**Εικόνα 37.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο ήπαρ. # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

#### Πρωτεϊνικά καρβονύλια

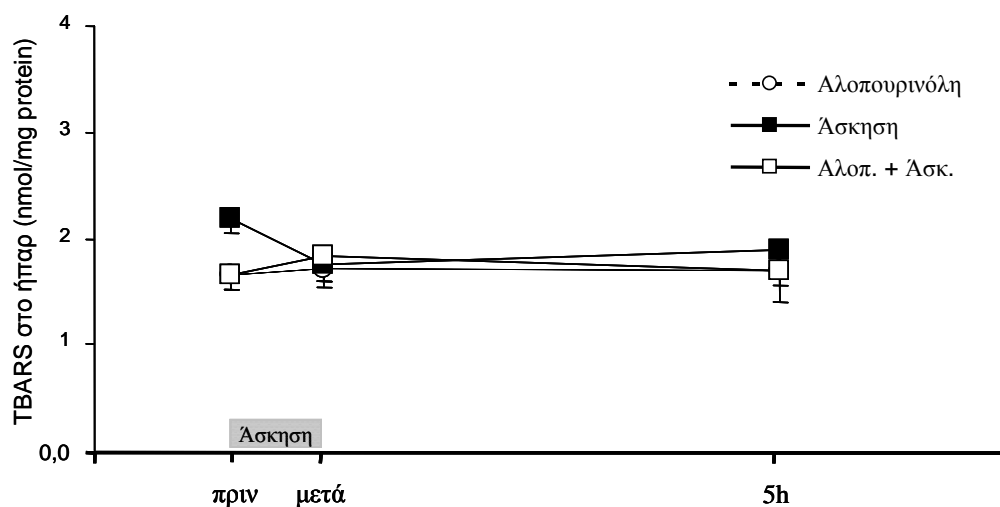
Δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 38).



**Εικόνα 38.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ.

## TBARS

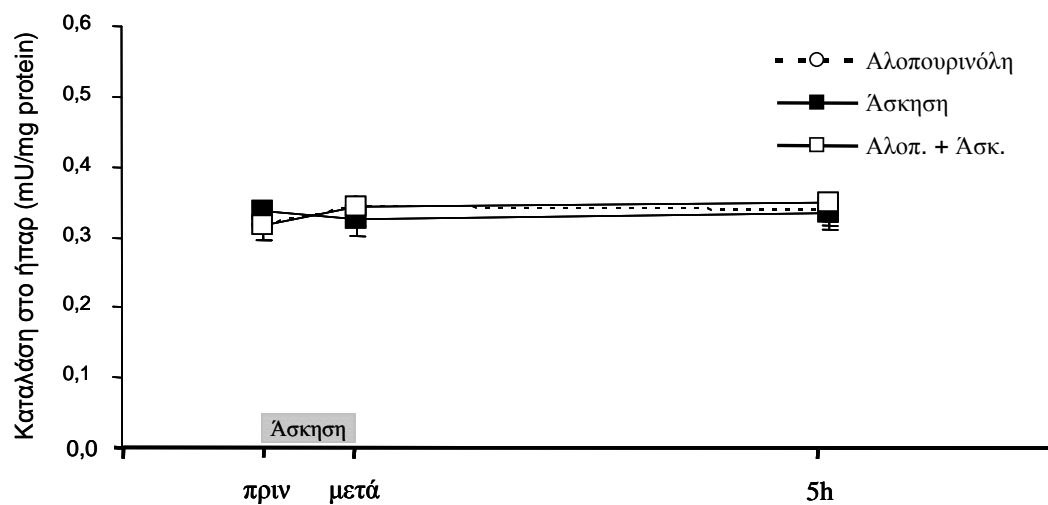
Δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 39).



**Εικόνα 39.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ.

## Καταλάση

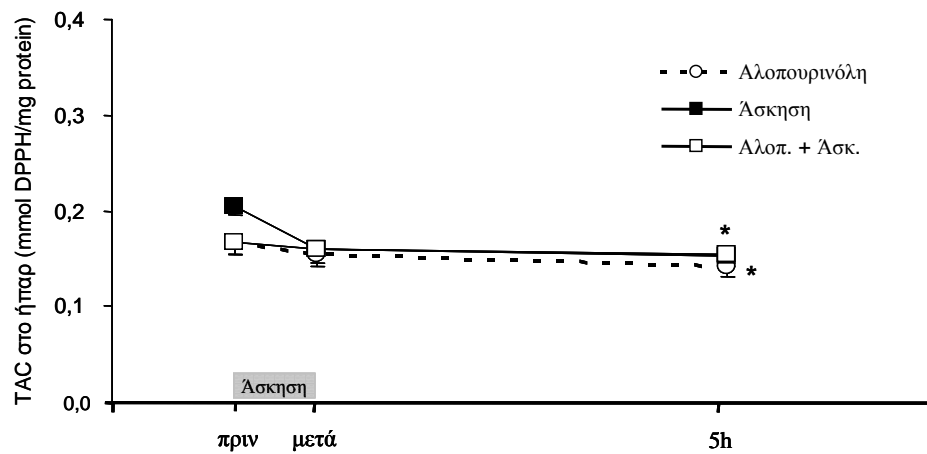
Δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 40).



**Εικόνα 40.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στο ήπαρ.

## TAC

Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου ( $P < 0,05$ ). Τόσο η χορήγηση αλοπουρινόλης όσο και η άσκηση μείωσαν την TAC (Εικόνα 41).

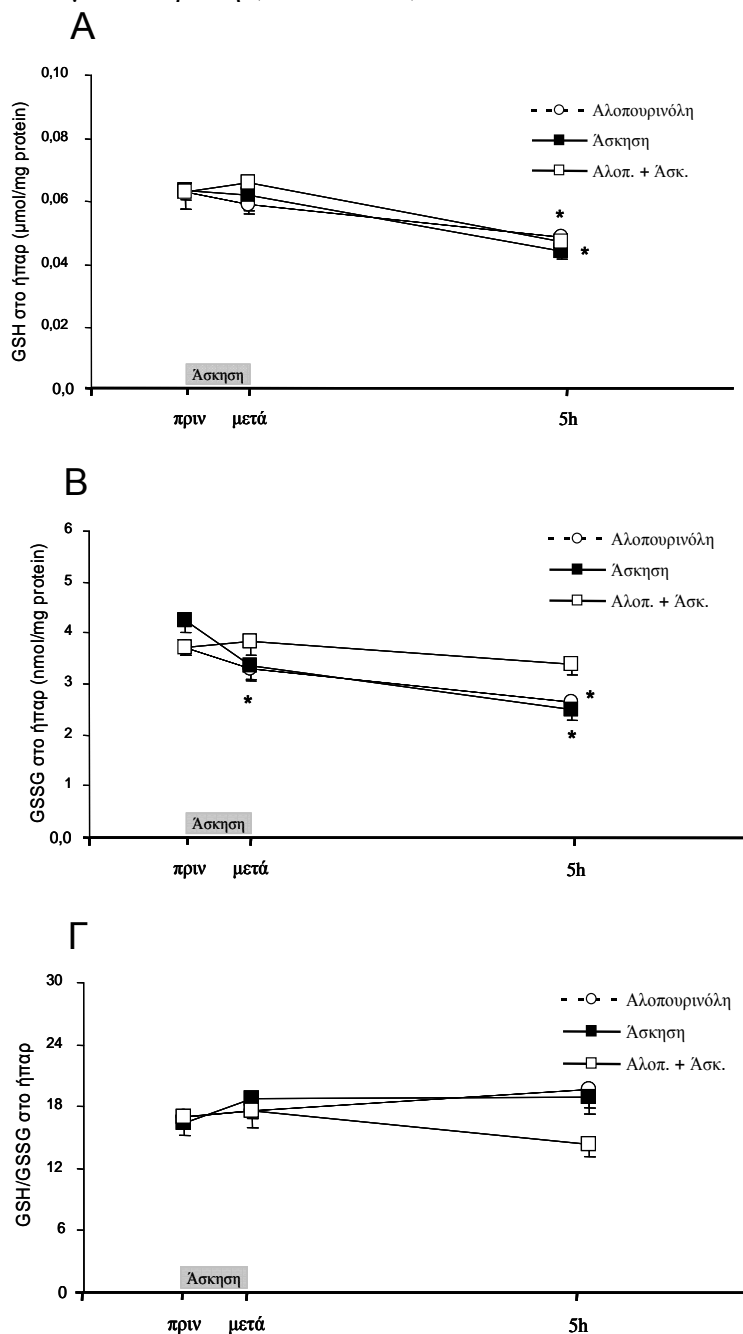


**Εικόνα 41.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην TAC στο ήπαρ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ).



### GSH, GSSG και GSH/GSSG

Για την GSH βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η χορήγηση αλοπουρινόλης και η άσκηση μείωσαν τη συγκέντρωσή της ( $P < 0,05$ ) (Εικόνα 42Α). Για την GSSG βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Τόσο η χορήγηση αλοπουρινόλης όσο και η άσκηση μείωσαν τη συγκέντρωση της GSSG (Εικόνα 42Β). Στο λόγο GSH/GSSG δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 42Γ).



**Εικόνα 42.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH (Α), της GSSG (Β) και του λόγου GSH/GSSG (Γ) στο ήπαρ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ).

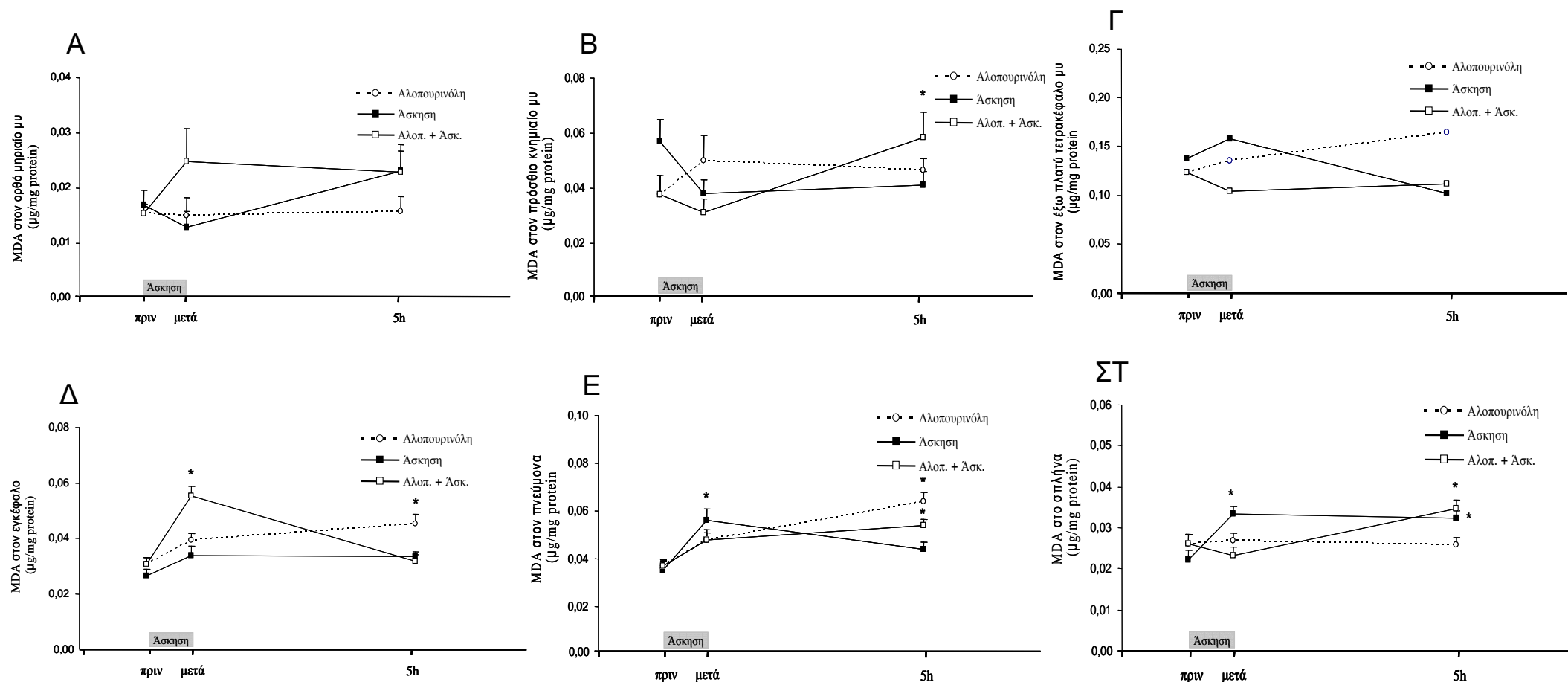
***1.6. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της MDA και της αλβουμίνης στον ορθό μηριαίο μυ (Rectus Femoris), τον πρόσθιο κνημιαίο μυ (Tibialis Anterior), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Vastus Lateralis), τον εγκέφαλο, τον πνεύμονα και το σπλήνα των επιμύων***

***MDA***

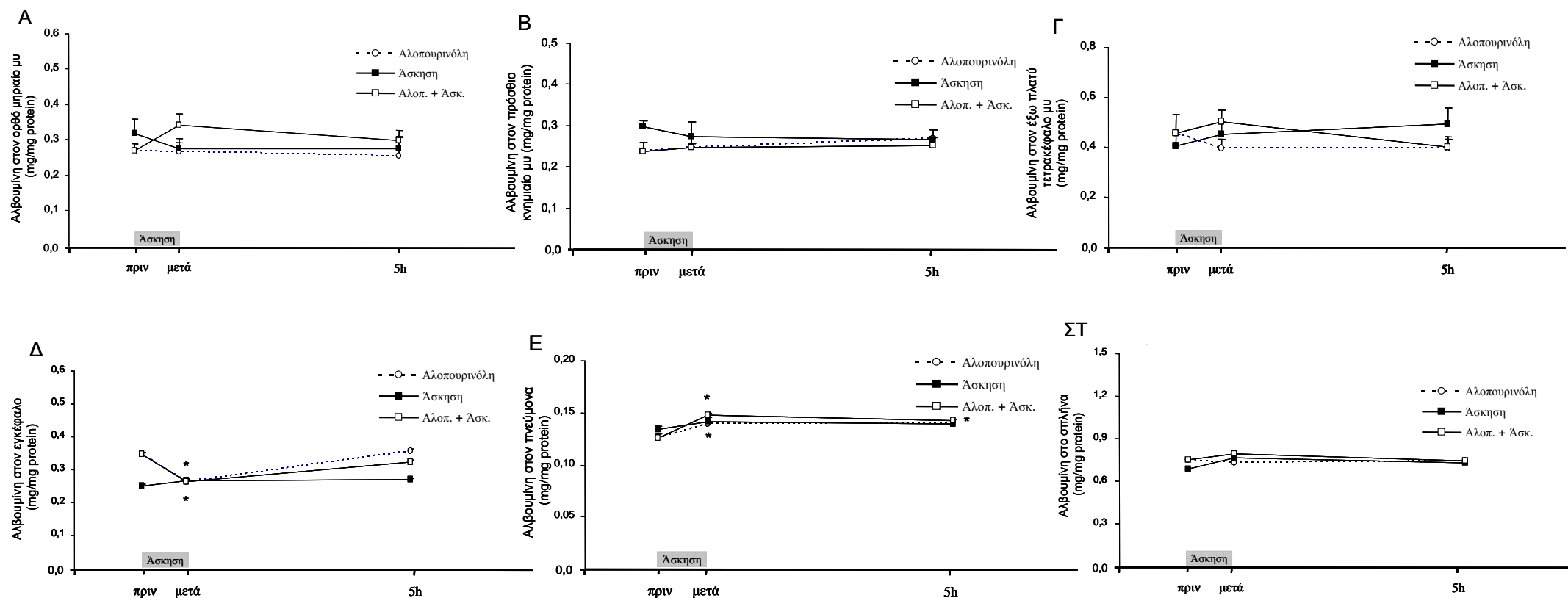
Στον πρόσθιο κνημιαίο μυ βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η MDA αυξήθηκε 5h μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση χρόνου και παρέμβασης. Η MDA μειώθηκε 5 h μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους που χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Στον εγκέφαλο βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η MDA δεν επηρεάστηκε από την άσκηση ενώ αυξήθηκε μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης τόσο στους επίμυες, που ασκήθηκαν όσο και σε εκείνους που δεν ασκήθηκαν. Στον πνεύμονα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η MDA αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους που χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Στο σπλήνα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η MDA αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους που χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Στον ορθό μηριαίο μυ δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 43).

***Αλβουμίνη***

Στους τρεις μυϊκούς ιστούς που εξετάστηκαν και το σπλήνα δε βρέθηκε καμία επίδραση. Στον εγκέφαλο βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου, της παρέμβασης και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης μειώθηκε μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης τόσο στους επίμυες που ασκήθηκαν όσο και σε εκείνους που δεν ασκήθηκαν. Στον πνεύμονα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε τόσο με τη χορήγηση αλοπουρινόλης όσο και με το συνδυασμό αλοπουρινόλης και άσκησης (Εικόνα 44).



**Εικόνα 43.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της MDA στον ορθό μηριαίο μυ (Α), τον πρόσθιο κνημιαίο μυ (Β), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Γ), τον εγκέφαλο (Δ), τον πνεύμονα (Ε) και το σπλήνα (ΣΤ) των επιμύων. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ).



**Εικόνα 44.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορθό μηριαίο μυ (Α), τον πρόσθιο κνημιαίο μυ (Β), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Γ), τον εγκέφαλο (Δ), τον πνεύμονα (Ε) και το σπλήνα (ΣΤ) των επιμύων. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ).

***1.7. Συσχέτιση συγκεκριμένων δεικτών οξειδωτικού στρες ώστε να ερευνηθεί αν όταν μετρώνται στο αίμα, αντανakλούν επαρκώς την οξειδοαναγωγική κατάσταση του σκελετικού μυός, του καρδιακού μυός και του ήπατος.***

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των δεικτών οξειδωτικού στρες ανάμεσα στο αίμα και τους ιστούς φαίνονται στον πίνακα 4. Όσον αφορά στην TAC και το λόγο GSH/GSSG, δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο αίμα και τους ιστούς που εξετάστηκαν. Αντίθετα, η GSSG ήταν ο μόνος δείκτης, που είχε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο αίμα και σε όλους τους ιστούς μετά από όλες τις πειραματικές παρεμβάσεις με τις ακόλουθες τιμές του συντελεστή  $r_s$ : σκελετικός μυς,  $r_s$ : 0,656–0,874, καρδιακός μυς 0,742–0,981 και ήπαρ 0,646–0,855. Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση για την XO και τα TBARS ανάμεσα στο αίμα και τον καρδιακό μυ (0,753–0,964 και 0,705–1,000, αντίστοιχα) και στο αίμα και το ήπαρ (0,755–0,902 και 0,656–1,000, αντίστοιχα) μετά από όλες τις πειραματικές παρεμβάσεις. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του σκελετικού και του καρδιακού μυός περιγράφονται επαρκώς από τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (0,652–1,000 και 0,656–0,964, αντίστοιχα), την GSH (0,693–1,000 και 0,656–1,000, αντίστοιχα) και την CAT (0,745–1,000 και 0,656–1,000, αντίστοιχα) όταν οι δείκτες αυτοί μετρώνται στο αίμα. Η παρουσία ή απουσία σημαντικής συσχέτισης ήταν ανεξάρτητες από την παρέμβαση και το χρονικό σημείο συλλογής των δειγμάτων αλλά και από την παρέμβαση (άσκηση ή χορήγηση αλοπουρινόλης) που εφαρμόστηκε κάθε φορά. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συσχέτισης ανάμεσα στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα αναφορικά με δύο δείκτες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τα TBARS, οι οποίοι έδειξαν υψηλή συσχέτιση μετά από όλες τις πειραματικές παρεμβάσεις.

**Πίνακας 4.** Συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στο αίμα και τους ιστούς μετά την άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης.

	XO	TBARS	Καρβονύλια	GSH	GSSG	GSH/GSSG	Καταλάση	TAC
<i>Control</i>								
Αίμα vs Σκελετικός μυς	ΜΣ	ΜΣ	0,879	0,927	0,874	ΜΣ	0,964	ΜΣ
Αίμα vs Καρδιακός μυς	0,964	0,705	0,964	1,000	0,848	ΜΣ	1,000	ΜΣ
Αίμα vs Ήπαρ	0,879	1,000	ΜΣ	ΜΣ	0,646	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
<i>Αλοπουρινόλη*</i>								
Αίμα vs Σκελετικός μυς	ΜΣ	ΜΣ	1,000	0,693	0,763	ΜΣ	1,000	ΜΣ
Αίμα vs Καρδιακός μυς	0,814	1,000	0,656	0,693	0,981	ΜΣ	0,705	ΜΣ
Αίμα vs Ήπαρ	0,902	1,000	ΜΣ	ΜΣ	0,855	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
<i>Αλοπουρινόλη<sup>#</sup></i>								
Αίμα vs Σκελετικός μυς	ΜΣ	ΜΣ	0,676	1,000	0,769	ΜΣ	0,745	ΜΣ
Αίμα vs Καρδιακός μυς	0,814	1,000	0,664	0,705	0,880	ΜΣ	0,887	ΜΣ
Αίμα vs Ήπαρ	0,875	0,656	ΜΣ	ΜΣ	0,705	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
<i>Άσκηση<sup>†</sup></i>								
Αίμα vs Σκελετικός μυς	ΜΣ	ΜΣ	0,652	1,000	0,695	ΜΣ	1,000	ΜΣ
Αίμα vs Καρδιακός μυς	0,875	0,987	0,658	0,656	0,963	ΜΣ	0,656	ΜΣ
Αίμα vs Ήπαρ	0,847	0,686	ΜΣ	ΜΣ	0,789	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
<i>Άσκηση<sup>§</sup></i>								
Αίμα vs Σκελετικός μυς	ΜΣ	ΜΣ	0,656	1,000	0,656	ΜΣ	1,000	ΜΣ
Αίμα vs Καρδιακός μυς	0,753	1,000	0,693	1,000	0,742	ΜΣ	0,927	ΜΣ
Αίμα vs Ήπαρ	0,755	0,656	ΜΣ	ΜΣ	0,832	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

XO, οξειδάση της ξανθίνης; TBARS, ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ; GSH, ανηγμένη γλουταθειόνη; GSSG, οξειδωμένη γλουταθειόνη; TAC, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. \*2.5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης; <sup>#</sup>7.5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης; <sup>†</sup>αμέσως μετά την άσκηση; <sup>§</sup>5h μετά την άσκηση; ΜΣ, μη σημαντικό.

**Πίνακας 5.** Συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα μετά την άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης.

	Control	Αλοπουρινόλη*	Αλοπουρινόλη <sup>#</sup>	Άσκηση <sup>¶</sup>	Άσκηση <sup>§</sup>
			<i>TBARS</i>		
Πλάσμα vs Ερυθροκύτταρα	1,000	1,000	1,000	0,927	1,000
			<i>Καρβονύλια</i>		
Πλάσμα vs Ερυθροκύτταρα	0,693	0,693	0,808	0,996	1,000

TBARS, ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

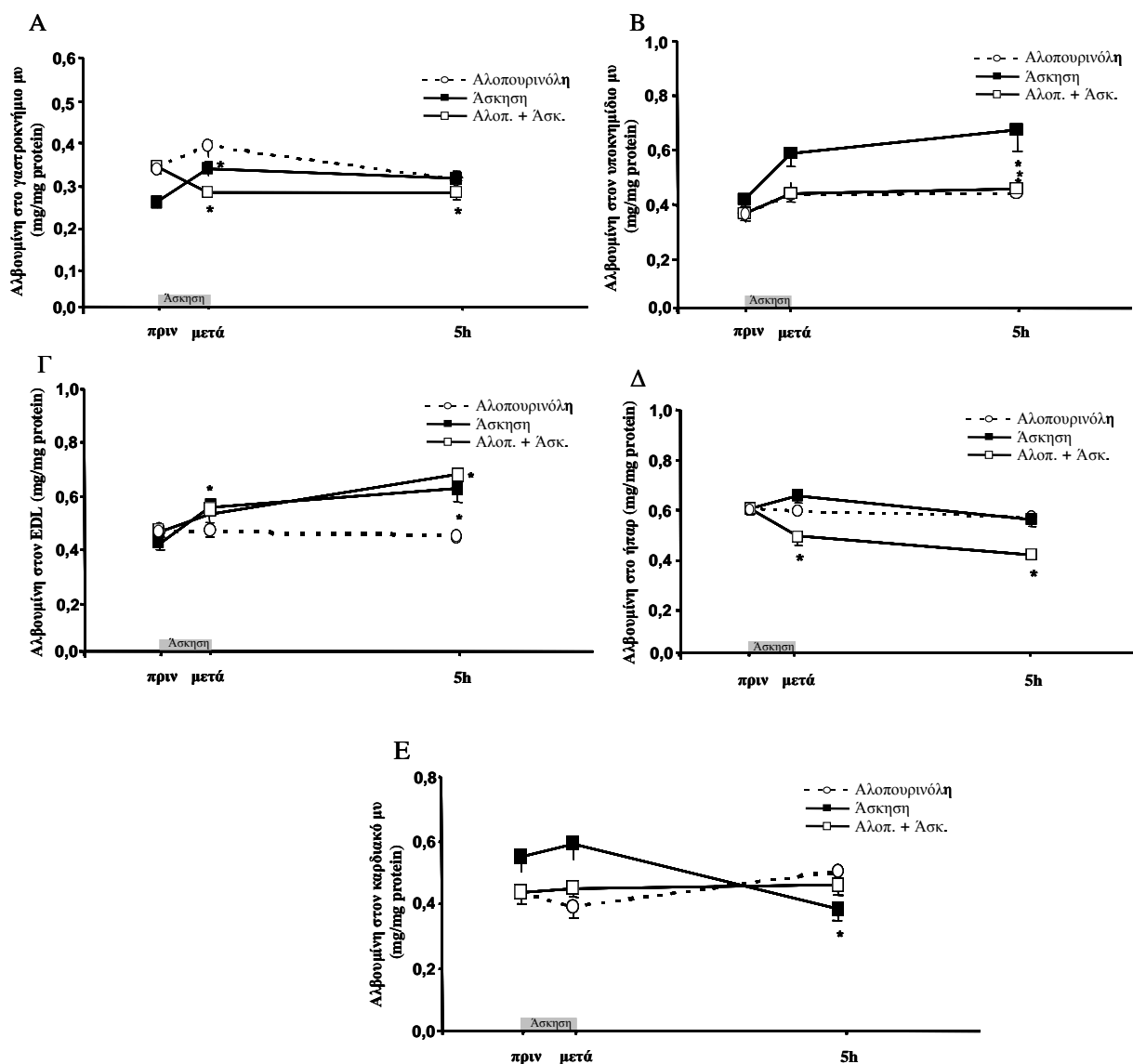
\*2.5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης; <sup>#</sup>7.5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης; <sup>¶</sup>αμέσως μετά την άσκηση; <sup>§</sup>5h μετά την άσκηση.

**1.8. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μονομερούς αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ, τον υποκνημίδιο μυ, τον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ και της διμερούς αλβουμίνης στον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ των επιμύων.**

*Φωτομετρικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αλβουμίνης*

Στο γαστροκνήμιο μυ βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,05$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ). Η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και έκαναν άσκηση ενώ μειώθηκε στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και έκαναν άσκηση. Η αλοπουρινόλη μόνη της δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 45Α). Στον υποκνημίδιο μυ βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,001$ ) και του χρόνου ( $P < 0,001$ ). Η άσκηση και ο συνδυασμός άσκησης και χορήγησης αλοπουρινόλης αύξησαν τη συγκέντρωση της αλβουμίνης ενώ η αλοπουρινόλη μόνη της δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 45Β). Στον EDL βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,001$ ), του χρόνου ( $P < 0,001$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,001$ ). Η άσκηση και ο συνδυασμός άσκησης και χορήγησης αλοπουρινόλης αύξησαν τη συγκέντρωση της αλβουμίνης ενώ η αλοπουρινόλη μόνη της δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 45Γ). Στο ήπαρ βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ( $P < 0,001$ ), του χρόνου ( $P < 0,001$ ) καθώς και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Ο συνδυασμός άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης μείωσαν τη συγκέντρωση της αλβουμίνης ενώ η άσκηση και η αλοπουρινόλη μόνες τους δεν είχαν καμία επίδραση (Εικόνα 45Δ). Στον καρδιακό μυ βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η άσκηση μείωσε τη συγκέντρωση της αλβουμίνης ενώ η χορήγηση αλοπουρινόλης και ο συνδυασμός τους δεν είχαν καμία επίδραση (Εικόνα 45Ε).

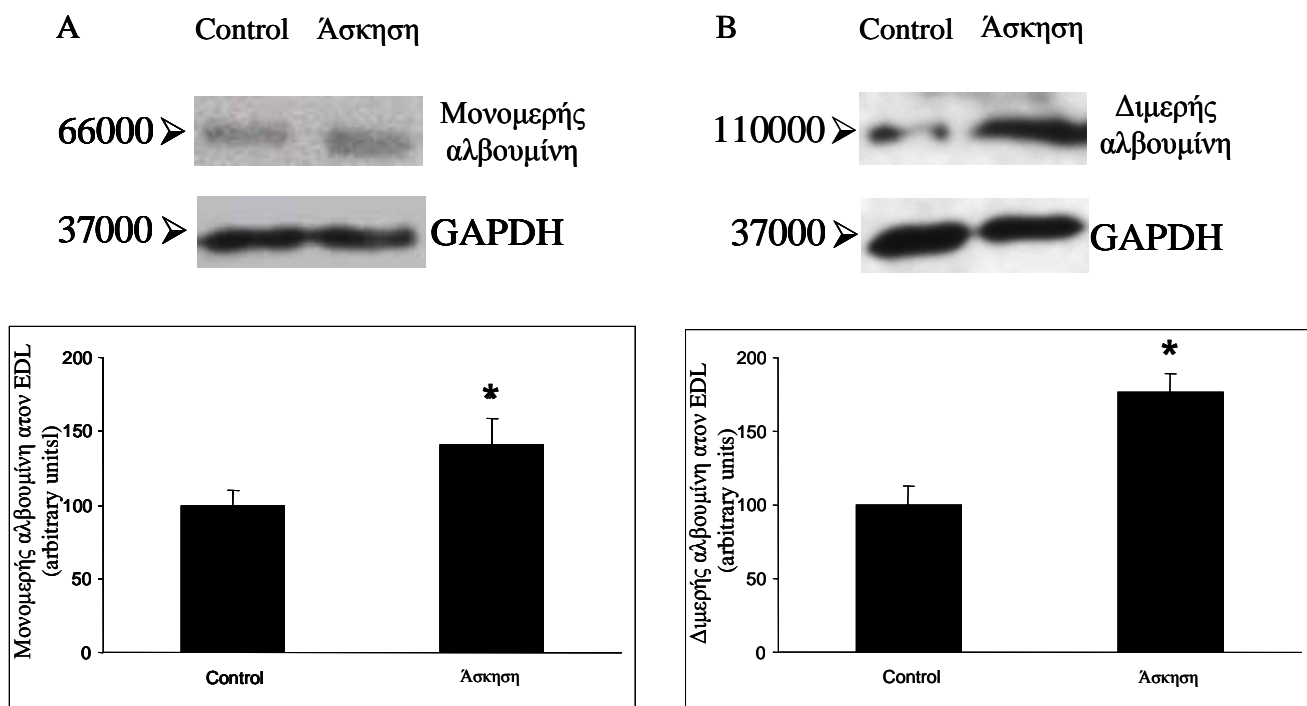




**Εικόνα 45.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ (Α), τον υποκνημίδιο μυ (Β), τον EDL (Γ), το ήπαρ (Δ) και τον καρδιακό μυ (Ε). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ).

#### Ανάλυση western για τη μονομερή και τη διμερή αλβουμίνη στον EDL

Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση western για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της φωτομετρικής ανάλυσης αλλά και για να υπολογιστεί η διμερής αλβουμίνη στον EDL. Όταν έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με αναγωγικό παράγοντα εμφανίστηκε μία λωρίδα στα 66 kDa. Όταν όμως δε χρησιμοποιήθηκε αναγωγικός παράγοντας εμφανίστηκε μία λωρίδα στα 110 kDa, η οποία αντιστοιχούσε στη διμερή αλβουμίνη. Η μονομερής και η διμερής αλβουμίνη αυξήθηκαν κατά 41% και 77% μετά την άσκηση (Εικόνα 46).



**Εικόνα 46.** Η ανίχνευση της μονομερούς (Α) και της διμερούς αλβουμίνης (Β) στον EDL των επιμύων μέσω ανάλυσης Western. Η αλβουμίνη διαχωρίστηκε με SDS-PAGE σε πήκτωμα 8% (w/v) σε αναγωγικές και μη αναγωγικές συνθήκες για τη μονομερή και τη διμερή αλβουμίνη, αντίστοιχα και ακολούθως μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF για ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αλβουμίνης. (Α) Στήλη 1: Η λωρίδα της αλβουμίνης που ανιχνεύθηκε από τους επίμυες της ομάδας control. Στήλη 2: Η λωρίδα της αλβουμίνης που ανιχνεύθηκε από τους ασκηθέντες επίμυες. (Β) Στήλη 1: Η λωρίδα της αλβουμίνης που ανιχνεύθηκε από τους επίμυες της ομάδας control. Στήλη 2: Η λωρίδα της αλβουμίνης που ανιχνεύθηκε από τους ασκηθέντες επίμυες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό control για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα της πρωτεΐνης.

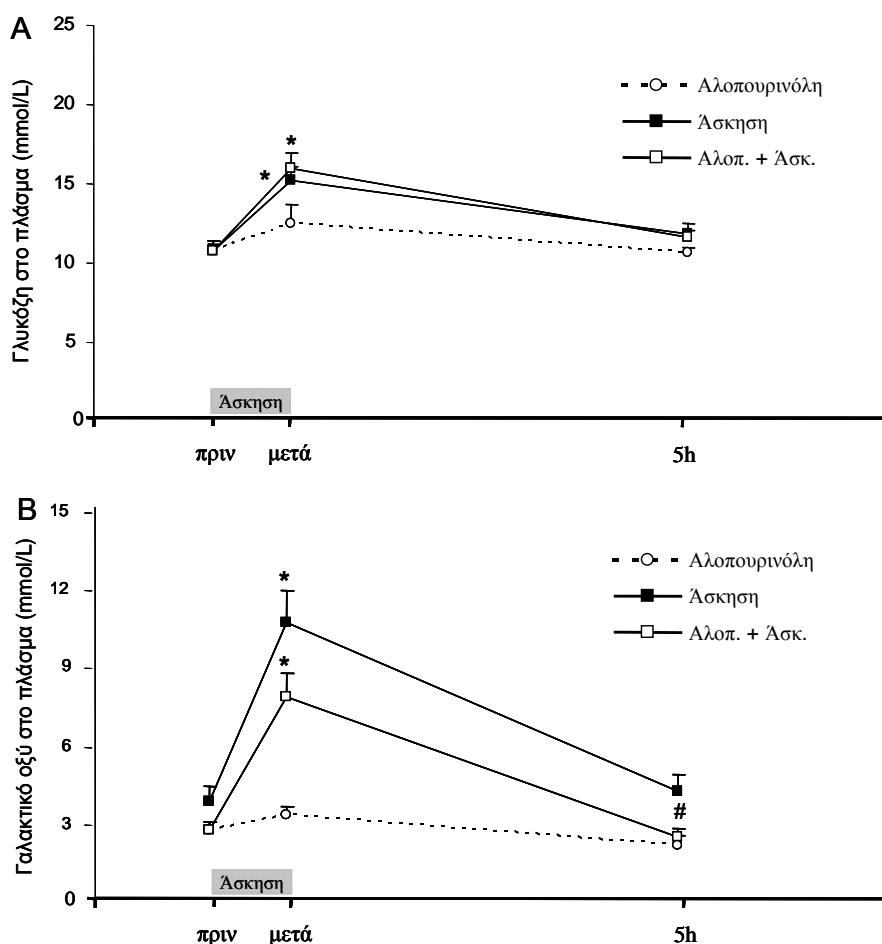
### 1.9. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων στο πλάσμα, τον υποκνημίδιο μυ και το ήπαρ των επιμύων.

#### Γλυκόζη και γαλακτικό οξύ στο πλάσμα

Για τη γλυκόζη βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η συγκέντρωσή της αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και μειώθηκε 5 h μετά πλησιάζοντας τα επίπεδα ηρεμίας. Η αλοπουρινόλη μόνη της δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 47Α).

Για το γαλακτικό οξύ βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου ( $P < 0,05$ ). Η

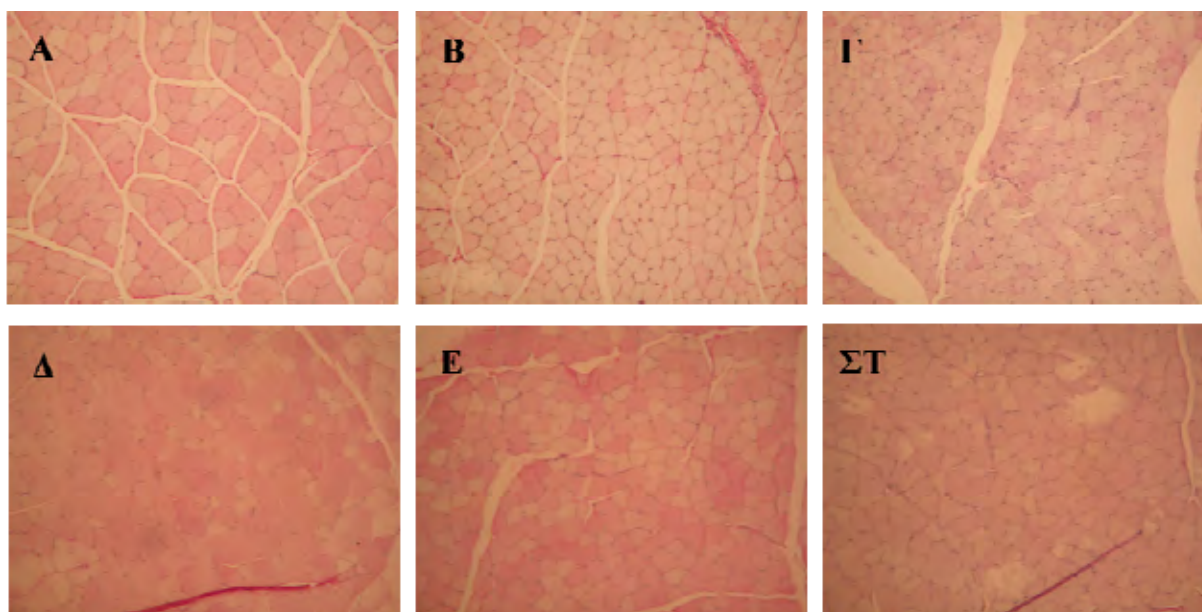
συγκέντρωσή του αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και μειώθηκε 5 h μετά πλησιάζοντας τα επίπεδα ηρεμίας. Η αλοπουρινόλη μόνη της δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 47B).



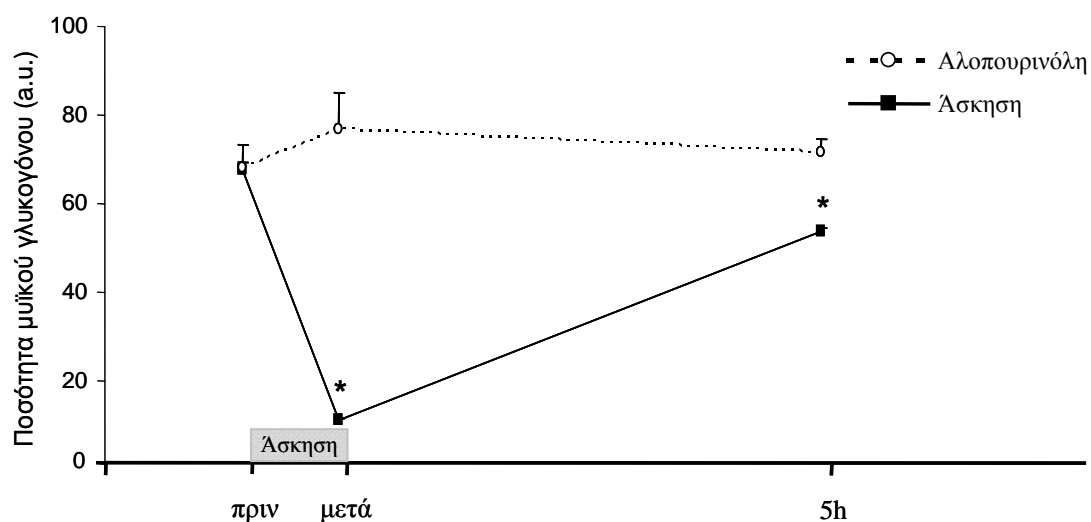
**Εικόνα 47.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης στο ίδιο χρονικό σημείο ( $P < 0,05$ ).

#### Γλυκογόνο στον υποκνημίδιο μυ και το ήπαρ

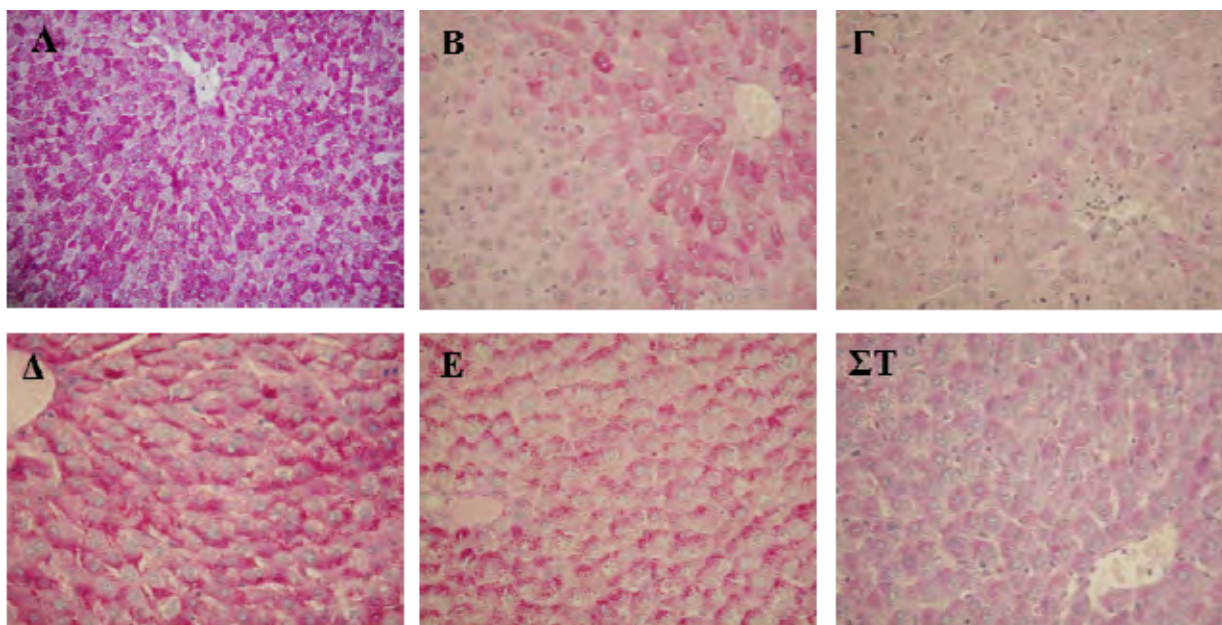
Τα επίπεδα του μυϊκού γλυκογόνου μειώθηκαν 2,5 h και 7,5 h μετά την άσκηση ενώ δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση αλοπουρινόλης (Εικόνες 48, 49). Τα επίπεδα του ηπατικού γλυκογόνου μειώθηκαν μετά την άσκηση όπως και 7,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό σχετικά με την άσκηση (Εικόνες 50, 51).



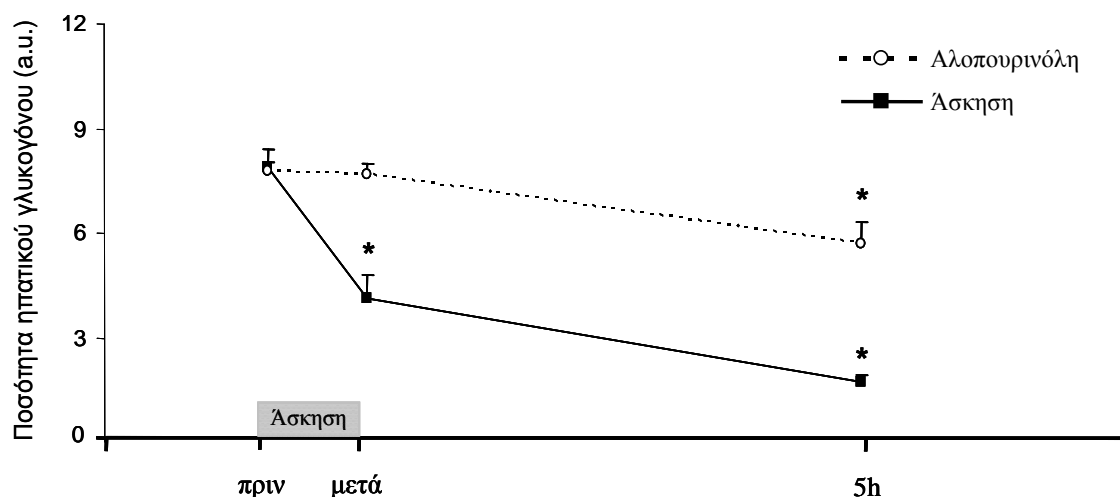
**Εικόνα 48.** Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff. Α: Ομάδα ελέγχου, Β: Αμέσως μετά την άσκηση, Γ: 5h μετά την άσκηση, Δ: 1,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, Ε: 2,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, ΣΤ: 7,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του γλυκογόνου (x10).



**Εικόνα 49.** Ποσοτικοποίηση της επίδρασης της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο.\* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $P < 0,05$ ).



**Εικόνα 50.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff. Α: Ομάδα ελέγχου, Β: Αμέσως μετά την άσκηση, Γ: 5h μετά την άσκηση, Δ: 1,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, Ε: 2,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, ΣΤ: 7,5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του γλυκογόνου (x10).

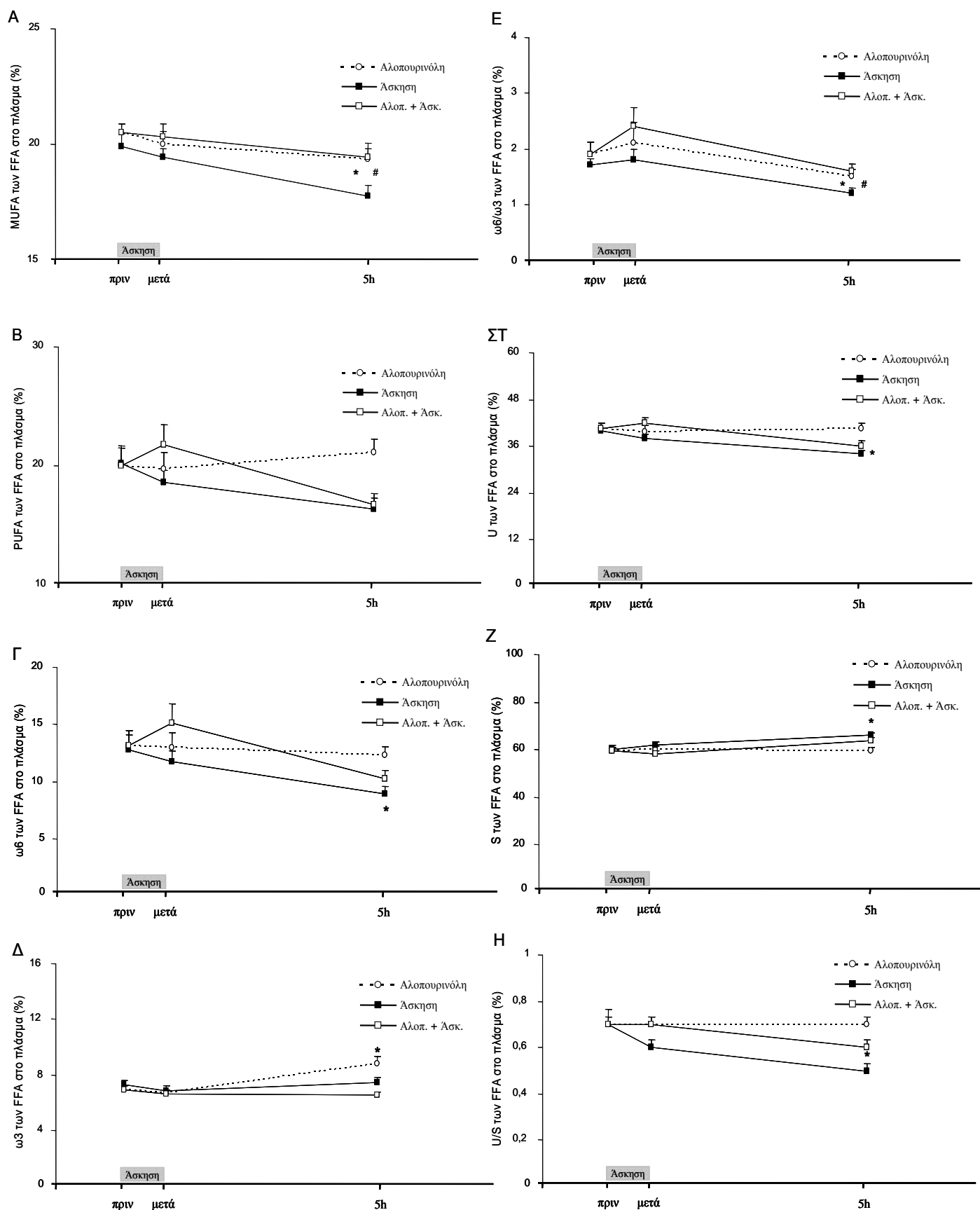


**Εικόνα 51.** Ποσοτικοποίηση της επίδρασης της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο.\* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $P < 0,05$ ).

### ***1.10. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο πλάσμα των επιμύων***

#### *Δείκτες των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος*

Όσον αφορά στα MUFA βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Παρατηρήθηκε μία πτώση της ποσοστιαίας τιμής τους μετά την άσκηση στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε DMSO. Στα PUFA δε βρέθηκε καμία επίδραση. Στα ω6 βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO. Στα ω3 βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους αυξήθηκε 7,5 h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Στο λόγο ω6/ω3 βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε DMSO. Στα U βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε DMSO. Στα S βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους αυξήθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε DMSO. Στο λόγο U/S βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO (Εικόνα 52).

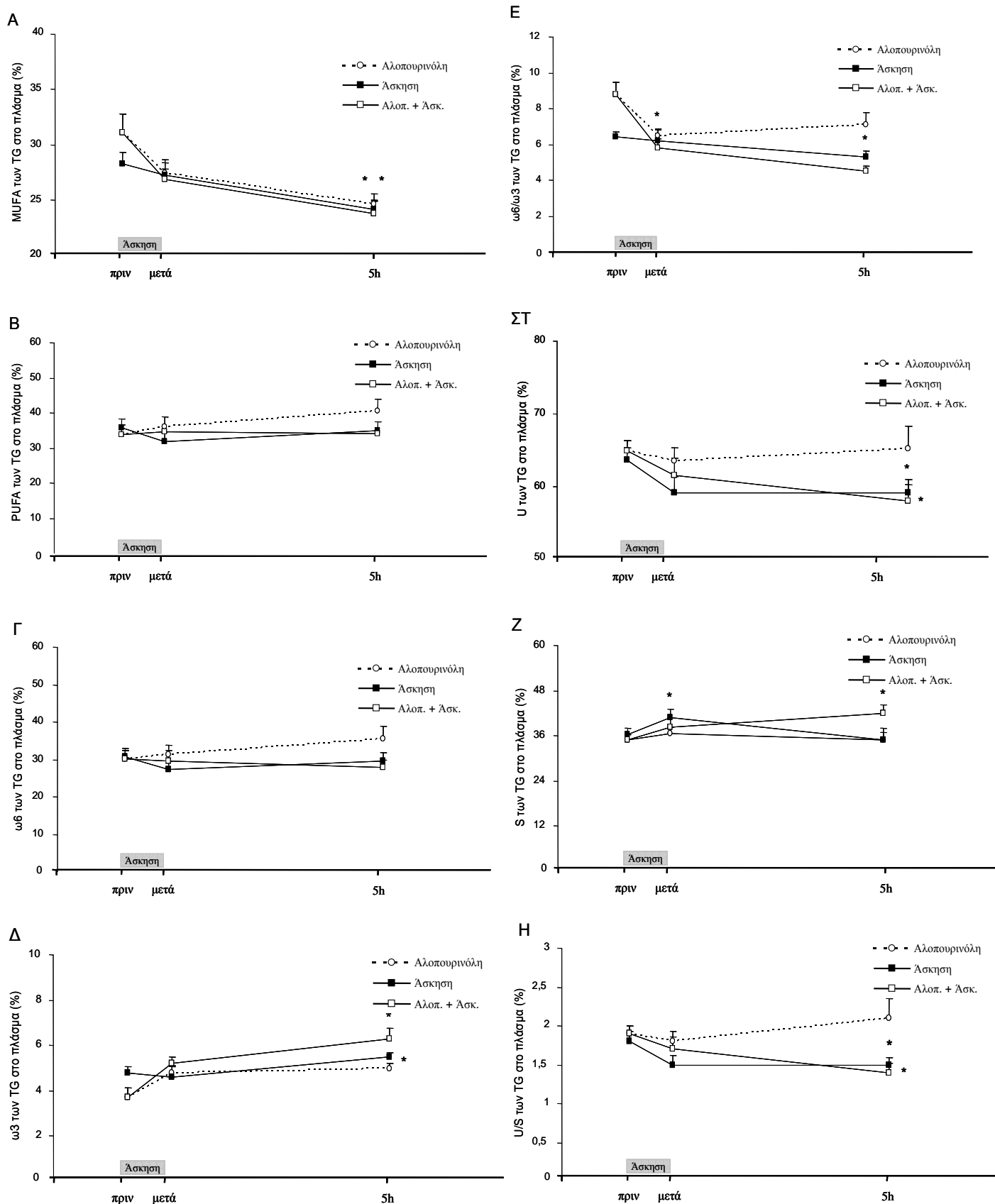


**Εικόνα 52.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στα ελεύθερα λιπαρά οξέα του πλάσματος. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ).

#### *Δείκτες των λιπαρών οξέων των TG του πλάσματος*

Όσον αφορά στα MUFA βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Παρατηρήθηκε μία πτώση της ποσοστιαίας τιμής τους μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης τόσο στην ομάδα που ασκήθηκε όσο και σε εκείνη που δεν ασκήθηκε. Στα PUFA και τα ω6 δε βρέθηκε καμία επίδραση. Στα ω3 παρατηρήθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους αυξήθηκε με την άσκηση τόσο στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη όσο και σε εκείνους που χορηγήθηκε DMSO. Στο λόγο ω6/ω3 παρατηρήθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης στους επίμυες που δεν ασκήθηκαν όσο και στους επίμυες, οι οποίοι ασκήθηκαν μετά τη χορήγηση DMSO. Στα U βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους, που χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Στα S βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η ποσοστιαία τιμή τους αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους, που χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Στο λόγο U/S βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η ποσοστιαία τιμή τους μειώθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους, που χορηγήθηκε αλοπουρινόλη (Εικόνα 53).

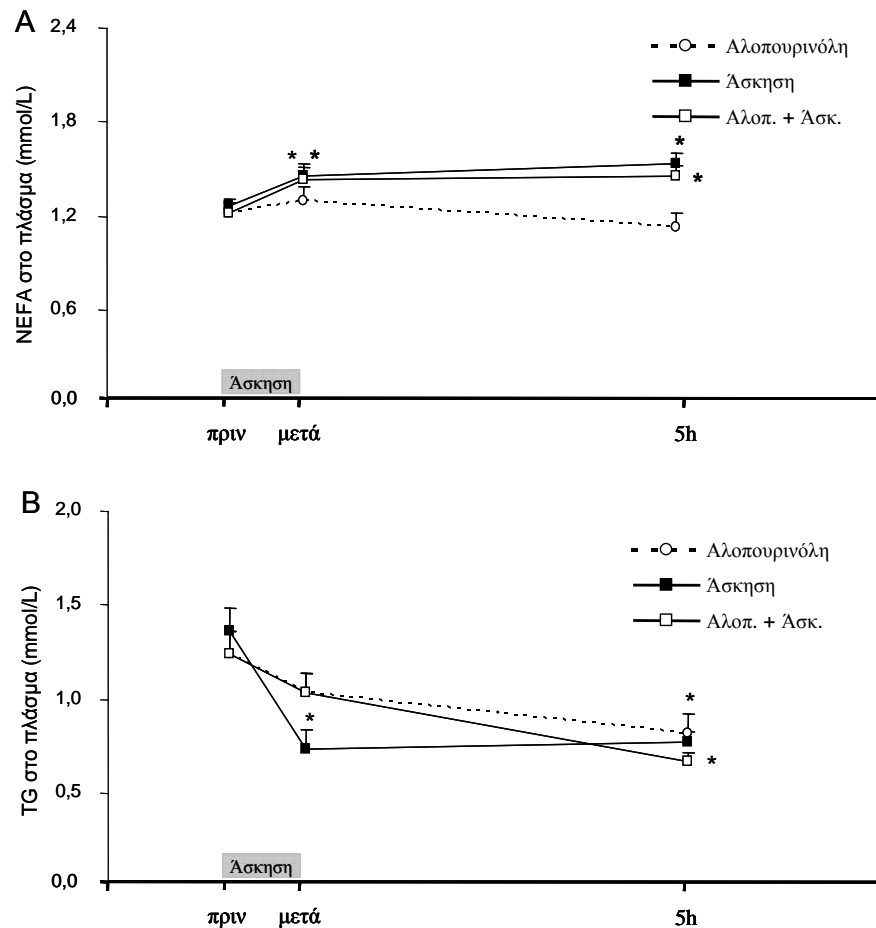




**Εικόνα 53.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στα λιπαρά οξέα των τριακυλογλυκερολών στο πλάσμα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ).

### NEFA και TG του πλάσματος

Τόσο στα NEFA όσο και στις TG βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η άσκηση και ο συνδυασμός αλοπουρινόλης και άσκησης αύξησαν τη συγκέντρωση των NEFA, ενώ η συγκέντρωση των TG μειώθηκε με την άσκηση και το συνδυασμό αλοπουρινόλης και άσκησης (Εικόνα 54).



**Εικόνα 54.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στα NEFA και τις τριακυλογλυκερόλες στο πλάσμα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την τιμή πριν στην ίδια ομάδα ( $P < 0,05$ ).

#### *Ελεύθερα λιπαρά οξέα και λιπαρά οξέα των TG στο πλάσμα*

Τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν ήταν το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0), το παλμιτελαϊκό (16:1ω7), το στεατικό (18:0), το ελαϊκό (18:1ω9), το *cis*-βαξενικό (18:1ω7), το λινελαϊκό (18:2ω6), το γ-λινελανικό (18:3ω6), το α-λινελανικό (18:3ω3), το γονδοϊκό (20:1ω9), το διομο-γ-λινελανικό (20:3ω6), το αραχιδονικό (20:4ω6), το τιμνοδικό (20:5ω3), το *cis,cis,cis,cis,cis*-4,7,10,13,16-εικοσιδιπεντενοϊκό (22:5ω6), το εικοσιδιπενταενοϊκό (22:5ω3) και το *cis,cis,cis,cis,cis,cis*-4,7,10,13,16,19-εικοσιδιεξενοϊκό (22:6ω3).

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων (mmol/L) και των ποσοστιαίων κατανομών (%) των επιμέρους λιπαρών οξέων των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος των επιμύων. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων (mmol/L) και των ποσοστιαίων κατανομών (%) των επιμέρους λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος των επιμύων.

Στους πίνακες 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής για τις συγκεντρώσεις και τις ποσοστιαίες κατανομές των επιμέρους λιπαρών οξέων των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος, αντίστοιχα.

**Πίνακας 6.** Συγκεντρώσεις και ποσοστιαία κατανομή των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος των επιμύων (mean ± SEM).

Λιπαρό οξύ	Αλοπουρινόλη			Άσκηση			Αλοπουρινόλη & άσκηση		
	1,5h μετά	2,5h μετά	7,5h μετά	Πριν	Μετά	5h μετά	Πριν	Μετά	5h μετά
Συγκέντρωση (mmol/L)									
14:0	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
16:0	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,02
16:1ω7	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
18:0	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,02
18:1ω9	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,05	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,33 ± 0,02
18:1ω7	0,16 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,03
18:2ω6	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
18:3ω6	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
18:3ω3	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
20:1ω9	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
20:3ω6	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
20:4ω6	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
20:5ω3	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
22:5ω6	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
22:6ω3	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Σύνολο	1,22 ± 0,06	1,29 ± 0,31	1,12 ± 0,28	1,26 ± 0,13	1,45 ± 0,25	1,54 ± 0,19	1,22 ± 0,20	1,44 ± 0,24	1,45 ± 0,04
Ποσοστιαία κατανομή (%)									
14:0	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,4	3,6 ± 0,3	3,5 ± 0,5	3,1 ± 0,5	3,7 ± 0,3
16:0	31,1 ± 0,6	31,1 ± 0,7	30,0 ± 0,3	30,8 ± 0,6	32,0 ± 1,3	31,8 ± 1,1	31,1 ± 0,6	30,7 ± 1,3	31,6 ± 1,0
16:1ω7	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,6	1,5 ± 0,4
18:0	24,9 ± 0,8	25,8 ± 0,9	25,9 ± 1,1	25,8 ± 1,1	26,6 ± 1,0	30,6 ± 0,8	24,9 ± 0,9	24,2 ± 1,1	28,6 ± 1,1
18:1ω9	16,2 ± 0,2	15,8 ± 1,2	15,9 ± 0,5	15,8 ± 1,0	15,6 ± 0,3	14,6 ± 1,2	16,2 ± 0,2	16,0 ± 1,1	15,7 ± 1,3
18:1ω7	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,7 ± 0,3
18:2ω6	9,3 ± 1,1	8,8 ± 1,1	8,0 ± 0,8	9,0 ± 1,2	8,5 ± 0,9	5,8 ± 1,6	9,3 ± 1,2	11,3 ± 1,5	6,8 ± 0,7
18:3ω6	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,1
18:3ω3	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,2
20:1ω9	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3
20:3ω6	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
20:4ω6	2,4 ± 0,2	2,6 ± 1,0	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,0 ± 0,6	1,7 ± 0,8	2,4 ± 0,6	2,5 ± 1,0	2,2 ± 0,5
20:5ω3	4,7 ± 0,3	4,4 ± 0,4	6,3 ± 1,4	4,9 ± 0,5	5,0 ± 1,2	5,7 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,5 ± 0,8	4,6 ± 0,7
22:5ω6	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1
22:6ω3	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2

**Πίνακας 7.** Συγκεντρώσεις και ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος των επιμύων (mean ± SEM).

Λιπαρό οξύ	Αλοπουρινόλη				Άσκηση				Αλοπουρινόλη & άσκηση		
	1,5h μετά	2,5h μετά	7,5h μετά		Πριν	Μετά	5h μετά		Πριν	Μετά	5h μετά
Συγκέντρωση (mmol/L)											
14:0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
16:0	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1		1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1		1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1
16:1ω7	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1		0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1		0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0
18:1ω9	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,0		0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1		0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,1
18:1ω7	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:2ω6	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1		1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2		1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1
18:3ω6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
18:3ω3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20:1ω9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20:3ω6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20:4ω6	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0		0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:5ω3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
22:5ω6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
22:5ω3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
22:6ω3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Σύνολο Λ.Ο στα TG	3,7 ± 0,4	3,1 ± 0,3	2,4 ± 0,3		4,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,5		3,7 ± 0,3	3,1 ± 0,3	2,0 ± 0,4
Σύνολο TG	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1		1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1		1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Ποσοστιαία κατανομή (%)											
14:0	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2		1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,2		1,2 ± 0,4	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2
16:0	27,1 ± 1,1	26,0 ± 0,9	24,0 ± 3,8		25,8 ± 2,3	26,8 ± 2,3	26,1 ± 2,4		27,1 ± 3,5	25,8 ± 1,1	25,7 ± 2,7
16:1ω7	3,3 ± 0,4	2,0 ± 0,3	1,2 ± 0,5		1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1		3,3 ± 1,8	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,4
18:0	6,7 ± 0,7	9,1 ± 0,8	9,5 ± 2,1		9,1 ± 1,0	12,4 ± 2,2	13,1 ± 1,0		6,7 ± 0,8	10,9 ± 1,5	14,3 ± 1,5
18:1ω9	24,0 ± 1,0	22,2 ± 0,7	20,6 ± 2,1		22,8 ± 2,6	22,3 ± 0,9	20,1 ± 1,9		24,0 ± 1,1	21,8 ± 1,9	19,5 ± 0,8
18:1ω7	3,4 ± 0,7	2,9 ± 0,2	2,4 ± 0,2		3,1 ± 0,5	2,6 ± 0,7	2,3 ± 0,4		3,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,2
18:2ω6	26,5 ± 2,2	26,6 ± 2,2	28,8 ± 2,7		26,3 ± 2,2	22,4 ± 6,7	24,0 ± 6,4		26,5 ± 2,3	24,6 ± 2,8	21,1 ± 2,2
18:3ω6	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0		0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0		0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
18:3ω3	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2		1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1		1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,4
20:1ω9	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1		0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1		0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
20:3ω6	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1		0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1		0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,1
20:4ω6	2,4 ± 0,5	3,2 ± 0,9	5,2 ± 1,2		2,8 ± 0,7	3,3 ± 0,3	4,1 ± 0,4		2,4 ± 0,5	3,5 ± 0,3	5,3 ± 0,3
20:5ω3	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,3		1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,2 ± 0,6		0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,5 ± 0,2
22:5ω6	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1		0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1		0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
22:5ω3	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0		0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0		0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0
22:6ω3	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,3		1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,4		0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2

**Πίνακας 8.** Στατιστική ανάλυση για τις συγκεντρώσεις και τις ποσοστιαίες κατανομές των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος.

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων				Ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων	
Λιπαρό οξύ	Παρέμβαση	Χρόνος	Παρέμβαση × Χρόνος	Παρέμβαση	Χρόνος
Συγκεντρώσεις					
14:0	0,064	-	-		
16:0	0,003	0,024	-	A – B ( $P = 0,001$ ) A – Γ ( $P = 0,007$ )	1 – 2 ( $P = 0,007$ )
16:1ω7	0,035	0,001	-	B – Γ ( $P = 0,031$ ) A – Γ ( $P = 0,020$ )	1 – 3 ( $P = 0,001$ ) 2 – 3 ( $P = 0,000$ )
18:0	0,002	0,008	-	A – B ( $P = 0,001$ ) A – Γ ( $P = 0,036$ )	1 – 2 ( $P = 0,027$ ) 1 – 3 ( $P = 0,003$ )
18:1ω9	0,002	0,008	-	A – B ( $P = 0,001$ ) A – Γ ( $P = 0,036$ )	1 – 2 ( $P = 0,027$ ) 1 – 3 ( $P = 0,003$ )
18:1ω7	0,011	0,025	-	A – B ( $P = 0,030$ ) A – Γ ( $P = 0,004$ )	1 – 2 ( $P = 0,013$ ) 2 – 3 ( $P = 0,027$ )
18:2ω6	0,004	0,000	0,035	A – Γ ( $P = 0,001$ ) B – Γ ( $P = 0,049$ )	A2 – Γ2 ( $P = 0,001$ ) B2 – Γ2 ( $P = 0,006$ ) A1 – A3 ( $P = 0,054$ ) B1 – B3 ( $P = 0,033$ ) Γ1 – Γ2 ( $P = 0,002$ ) Γ2 – Γ3 ( $P = 0,001$ )
18:3ω6	-	0,013	-	-	1 – 2 ( $P = 0,10$ ) 1 – 3 ( $P = 0,011$ )
18:3ω3	-	0,013	-	-	1 – 2 ( $P = 0,10$ ) 1 – 3 ( $P = 0,011$ )
20:1ω9	0,030	0,015	-	A – B ( $P = 0,022$ ) B – Γ ( $P = 0,021$ )	1 – 3 ( $P = 0,029$ ) 2 – 3 ( $P = 0,006$ )
20:3ω6	-	0,019	-	-	1 – 2 ( $P = 0,13$ ) 1 – 3 ( $P = 0,017$ )
20:4ω6	-	-	-		
20:5ω3	-	-	-		
22:5ω6	0,019	0,008	-	A – B ( $P = 0,010$ ) B – Γ ( $P = 0,022$ )	1 – 3 ( $P = 0,002$ )
22:6ω3	-	-	-		
Σύνολο	0,003	0,021	-	A – B ( $P = 0,001$ ) A – Γ ( $P = 0,011$ )	1 – 2 ( $P = 0,010$ ) 1 – 3 ( $P = 0,027$ )
Ποσοστά					
14:0	-	0,020	-	-	2 – 3 ( $P = 0,005$ )
16:0	-	-	-		
16:1ω7	0,047	0,000	-	B – Γ ( $P = 0,014$ )	1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,001$ )
18:0	0,019	0,000	-	A – B ( $P = 0,008$ ) B – Γ ( $P = 0,031$ )	1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,001$ )
18:1ω9	0,043	0,044	-	A – B ( $P = 0,030$ ) B – Γ ( $P = 0,029$ )	1 – 3 ( $P = 0,014$ )
18:1ω7	-	0,000	-	B – Γ ( $P = 0,051$ )	1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,002$ )
18:2ω6	-	0,004	-	-	1 – 3 ( $P = 0,007$ ) 2 – 3 ( $P = 0,002$ )
18:3ω6	-	-	-		
18:3ω3	0,001	0,037	-	A – B ( $P = 0,000$ ) B – Γ ( $P = 0,022$ )	1 – 3 ( $P = 0,012$ )
20:1ω9	-	-	-		
20:3ω6	-	-	-		
20:4ω6	0,044	-	-	A – B ( $P = 0,013$ )	-
20:5ω3	0,041	0,001	0,033	A – Γ ( $P = 0,027$ ) B – Γ ( $P = 0,020$ )	A3 – Γ3 ( $P = 0,001$ ) B3 – Γ3 ( $P = 0,054$ ) A1 – A3 ( $P = 0,001$ ) A2 – A3 ( $P = 0,000$ )
22:5ω6	-	-	-		
22:6ω3	-	-	-		

A: χορήγηση αλοπουρινόλης, B: άσκηση, Γ: αλοπουρινόλη και άσκηση, 1: 1,5h για την ομάδα A & Πριν την άσκηση, 2: 2,5h μετά για την ομάδα A & μετά την άσκηση, 3: 7,5h μετά για την ομάδα A & 5 ώρες μετά την άσκηση.

**Πίνακας 9.** Στατιστική ανάλυση για τις συγκεντρώσεις και τις ποσοστιαίες κατανομές των ελεύθερων λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος.

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων				Ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων	
Λιπαρό οξύ	Παρέμβαση	Χρόνος	Παρέμβαση × Χρόνος	Παρέμβαση	Χρόνος
Συγκέντρωση					
14:0	-	0,001	0,031	-	A1 – A2 ( $P = 0,061$ ) A1 – B1 ( $P = 0,077$ ) A1 – Γ1 ( $P = 0,077$ ) B1 – B2 ( $P = 0,000$ ) B1 – B3 ( $P = 0,005$ )
16:0	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,013$ )
16:1ω7	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,011$ )
18:0	-	-	0,026	A – B ( $P = 0,060$ )	A1 – B1 ( $P = 0,029$ ) B1 – B2 ( $P = 0,011$ ) B1 – Γ1 ( $P = 0,029$ )
18:1ω9	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,004$ )
18:1ω7	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,005$ )
18:2ω6	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,004$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ )
18:3ω6	-	0,007	0,045	-	A1 – B1 ( $P = 0,038$ ) B1 – B2 ( $P = 0,003$ ) B1 – B3 ( $P = 0,004$ ) B1 – Γ1 ( $P = 0,038$ )
18:3ω3	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,012$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ )
20:1ω9	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,014$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ )
20:3ω6	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,005$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,008$ )
20:4ω6	-	-	0,034	-	B1 – B2 ( $P = 0,028$ )
20:5ω3	0,003	-	0,000	A – B ( $P = 0,001$ ) A – Γ ( $P = 0,037$ )	A1 – A2 ( $P = 0,065$ ) A1 – B1 ( $P = 0,00$ ) A3 – B3 ( $P = 0,020$ ) A3 – Γ3 ( $P = 0,040$ ) B1 – B2 ( $P = 0,003$ ) B1 – B3 ( $P = 0,029$ ) B1 – Γ1 ( $P = 0,000$ ) B2 – Γ2 ( $P = 0,073$ ) Γ1 – Γ2 ( $P = 0,003$ ) Γ1 – Γ3 ( $P = 0,002$ )
22:5ω6	- -	0,026 0,027	0,010 0,010	-	A3 – B3 ( $P = 0,012$ ) A3 – Γ3 ( $P = 0,071$ ) B1 – B2 ( $P = 0,002$ ) B1 – B3 ( $P = 0,001$ )
22:5ω3	-	0,004	-	-	1 – 2 ( $P = 0,021$ ) 1 – 3 ( $P = 0,001$ )
22:6ω3	-	-	0,006	-	A1 – B1 ( $P = 0,015$ ) B1 – B2 ( $P = 0,001$ ) B1 – B3 ( $P = 0,034$ )

					B1 – Γ1 ( $P = 0,015$ )
Σύνολο Λ.Ο. στα TG	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,032$ )
Σύνολο TG	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,032$ )
Ποσοστά					
14:0	0,006	0,016	-	A – B ( $P = 0,005$ ) A – Γ ( $P = 0,007$ )	1 – 2 ( $P = 0,028$ ) 1 – 3 ( $P = 0,007$ )
16:0	-	-	-		
16:1ω7	-	0,000	-	A – B ( $P = 0,064$ ) B – Γ ( $P = 0,070$ )	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,010$ )
18:0	0,007	0,000	-	A – B ( $P = 0,002$ ) A – Γ ( $P = 0,029$ )	1 – 2 ( $P = 0,001$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ )
18:1ω9	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,031$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,005$ )
18:1ω7	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,000$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,032$ )
18:2ω6	-	-	-		
18:3ω6	-	-	-		
18:3ω3	-	-	-		
20:1ω9	-	-	-		
20:3ω6	-	-	-		
20:4ω6	-	0,000	-	-	1 – 2 ( $P = 0,002$ ) 1 – 3 ( $P = 0,000$ ) 2 – 3 ( $P = 0,000$ )
20:5ω3	0,001	0,000	0,024	A – B ( $P = 0,000$ ) A – Γ ( $P = 0,004$ )	A1 – A2 ( $P = 0,053$ ) A1 – B1 ( $P = 0,04$ ) A3 – B3 ( $P = 0,006$ ) A3 – Γ3 ( $P = 0,000$ ) B1 – B3 ( $P = 0,040$ ) B1 – Γ1 ( $P = 0,04$ ) Γ1 – Γ2 ( $P = 0,003$ ) Γ1 – Γ3 ( $P = 0,000$ ) Γ2 – Γ3 ( $P = 0,049$ )
22:5ω6	0,013	0,002	0,002	A – B ( $P = 0,005$ ) A – Γ ( $P = 0,032$ )	A3 – B3 ( $P = 0,000$ ) A3 – Γ3 ( $P = 0,059$ ) B3 – Γ3 ( $P = 0,050$ ) Γ1 – Γ3 ( $P = 0,054$ )
22:5ω3	-	-	-		
22:6ω3	-	0,000	0,017	-	A1 – A3 ( $P = 0,000$ ) A1 – B1 ( $P = 0,067$ ) A2 – A3 ( $P = 0,079$ ) B1 – Γ1 ( $P = 0,067$ ) B3 – Γ3 ( $P = 0,052$ ) Γ1 – Γ2 ( $P = 0,036$ ) Γ1 – Γ3 ( $P = 0,000$ ) Γ2 – Γ3 ( $P = 0,007$ )

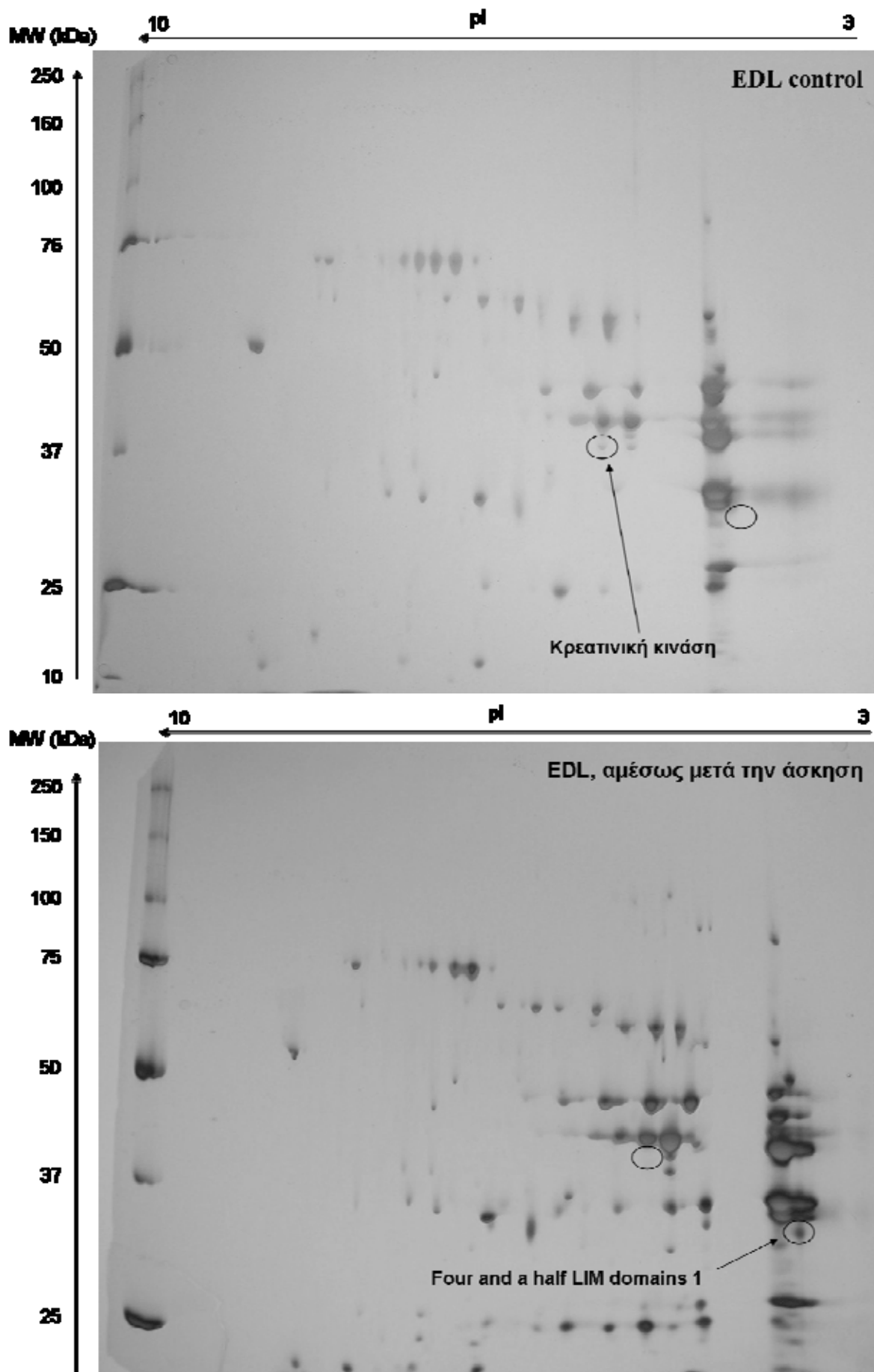
A: χορήγηση αλοπουρινόλης, B: άσκηση, Γ: αλοπουρινόλη και άσκηση, 1: 1,5h για την ομάδα A & Πριν την άσκηση, 2: 2,5h μετά για την ομάδα A & μετά την άσκηση, 3: 7,5h μετά για την ομάδα A & 5 ώρες μετά την άσκηση.



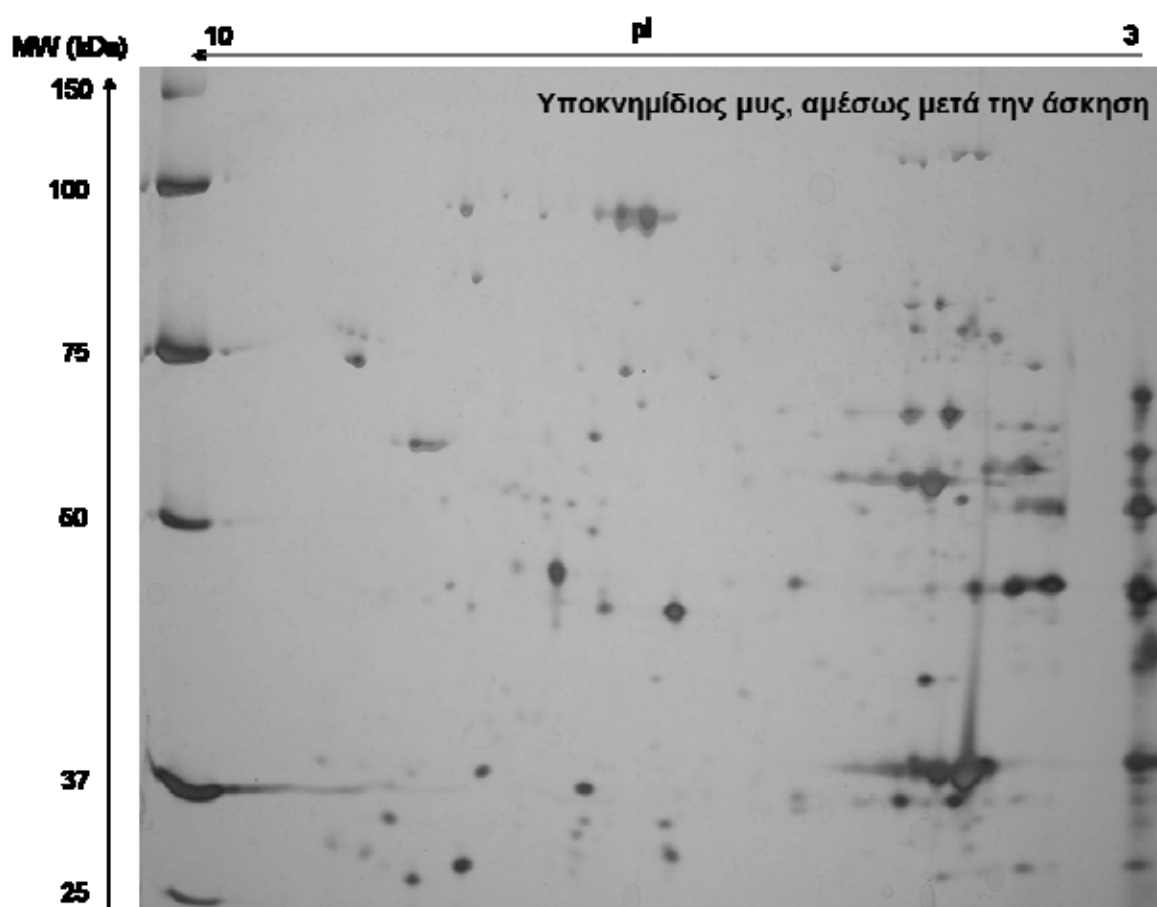
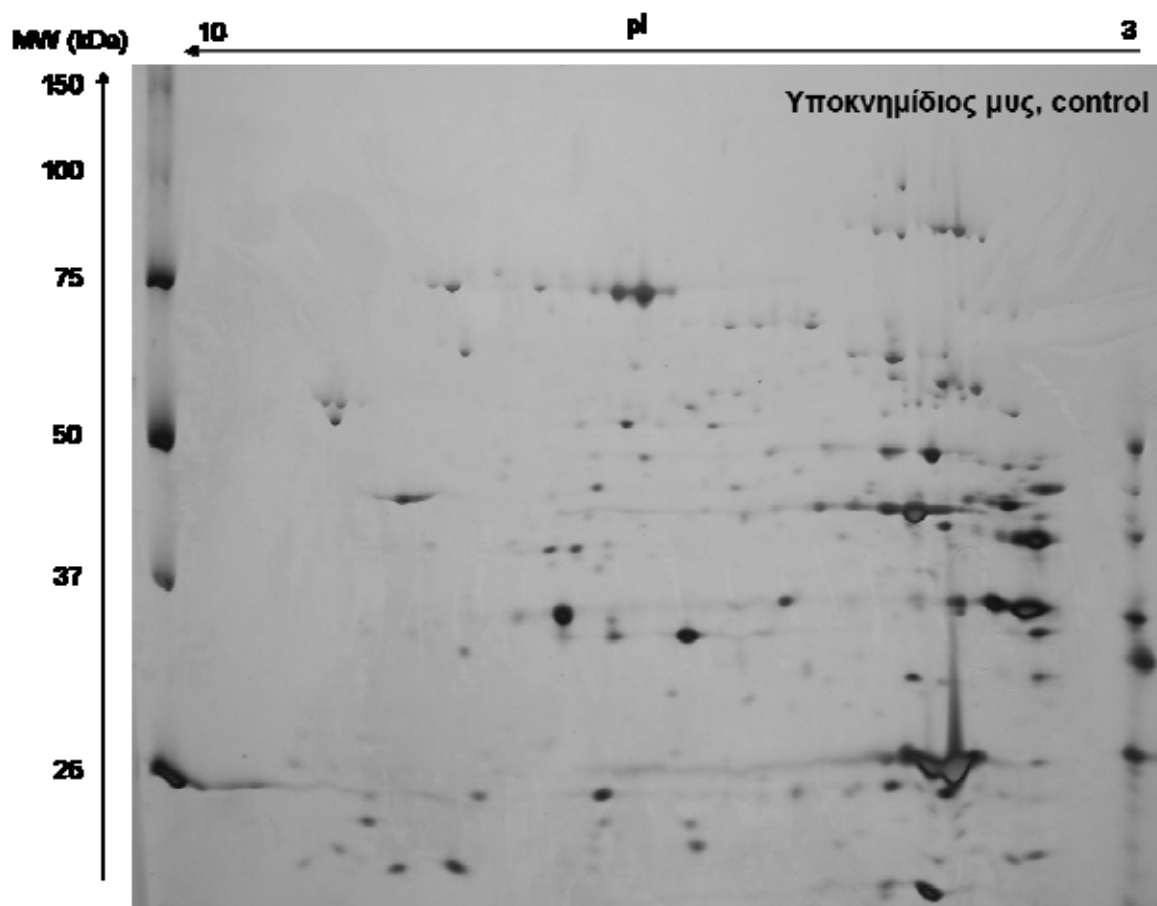
**1.11. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην πρωτεϊνική έκφραση στον υποκνημίδιο και τον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ των επιμύων**

Μετά την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων στον EDL βρέθηκαν δύο κηλίδες, οι οποίες μεταβλήθηκαν με επαναλήψιμο τρόπο. Η πρώτη κηλίδα εξαφανιζόταν με επαναλήψιμο τρόπο από τους επίμυες μετά την άσκηση. Η κηλίδα αυτή αποκόπηκε από το πήκτωμα και στάλθηκε για φασματοσκοπία μάζας για να ταυτοποιηθεί. Έτσι, βρέθηκε ότι η κηλίδα αυτή αντιστοιχούσε στην πρωτεΐνη *κρεατινική κινάση* με μοριακό βάρος 37 kDa. Επίσης, ακόμα μία κηλίδα αποκόπηκε και στάλθηκε για ταυτοποίηση. Η κηλίδα αυτή εμφανίστηκε στον EDL αμέσως μετά την άσκηση και αντιστοιχούσε πρωτεΐνη *Four and a half LIM domains 1* με μοριακό βάρος 33 kDa (Εικόνα 55).

Όσον αφορά στον υποκνημίδιο μυ, δεν αποκόπηκε καμία κηλίδα καθώς δε βρέθηκαν επαναλήψιμες αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 56).



**Εικόνα 55.** Πηκτώματα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων στον EDL στις ομάδες control και άσκηση.



**Εικόνα 56.** Πηκτώματα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων στον υποκνημίδιο μυ στις ομάδες control και άσκηση.

## **2. IN VITRO ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΕ ENZYMA** **ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ** **ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ**

### ***2.1. Η ανασταλτική δράση εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της XO, της CAT και της SOD***

Όλα τα εκχυλίσματα, που εξετάστηκαν ανέστειλαν τη δραστικότητα της XO. Οι τιμές IC<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 36 ως 250 µg/mL για τα εκχυλίσματα των καρπών, από 2,5 ως 60 µg/mL για τα εκχυλίσματα των βόστρυχων και από 15 ως 75 µg/mL για τα εκχυλίσματα των στέμφυλων. Τα εκχυλίσματα των καρπών είχαν μικρότερη ανασταλτική δράση συγκριτικά με τα εκχυλίσματα από τους βόστρυχους και τα στέμφυλα. Η αλοπουρινόλη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και ανέστειλε τη δραστικότητα της XO με τιμή IC<sub>50</sub> 2,1 µM

Όλα τα εκχυλίσματα, που εξετάστηκαν ανέστειλαν τη δραστικότητα της CAT. Τα εκχυλίσματα από τους βόστρυχους ήταν τα πιο ισχυρά καθώς οι τιμές IC<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 1,5 ως 27 µg/mL. Οι τιμές IC<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 4 ως 34 µg/mL για τα εκχυλίσματα στέμφυλων και από 40 ως 214 µg/mL για τα εκχυλίσματα καρπών. Το αζίδιο του νατρίου χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και ανέστειλε τη δραστικότητα της CAT με τιμή IC<sub>50</sub> 0,35 µM

Τα περισσότερα εκχυλίσματα έδειξαν ενεργοποίηση στη δραστικότητα της SOD και οι τιμές PC<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 180 ως 650 µg/mL. Παρατηρήθηκε, επίσης, η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> όπως φάνηκε από τη μερική αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Επιδράσεις των εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα των XO, CAT και SOD.

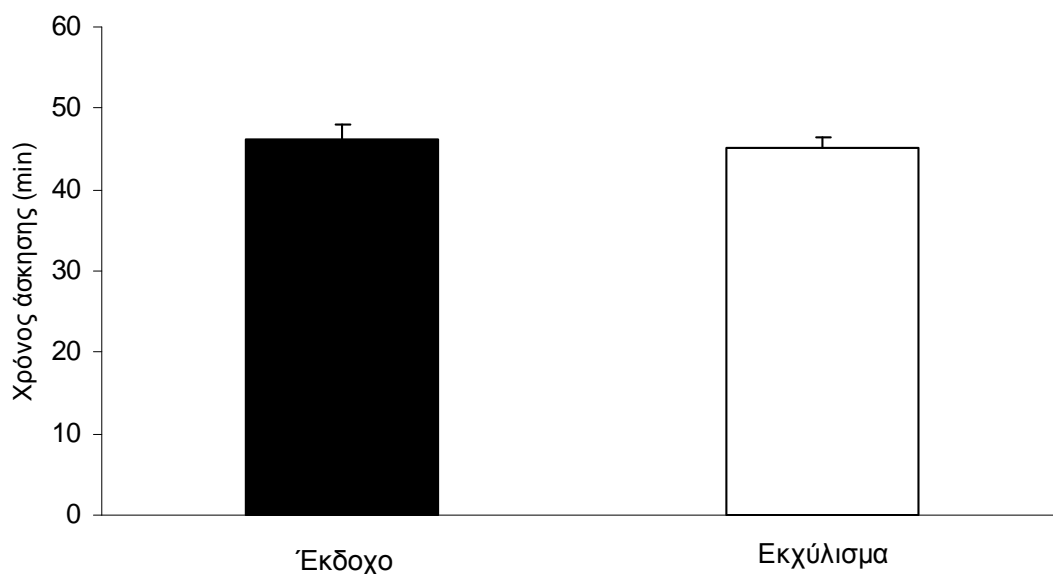
Τμήματα των φυτών	Ποικιλίες σταφυλιών <i>vitis vinifera</i>	IC <sub>50</sub> (μg/ml) Αναστολή			PC <sub>50</sub> (μg/ml) Ενεργοποίηση		Αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης	
		XO	TPC στην IC <sub>50</sub>	CAT	TPC στην IC <sub>50</sub>	SOD	TPC στην PC <sub>50</sub>	% Αναστολή
Βόστρυχοι	Αθήρι Σαντορίνης 2007	2,5 ± 0,6	1,2	5± 0,5	2,3	300 ± 13	139	-
	Ασύρτικο Σαντορίνης 2006	8 ± 1	3,6	1,5 ± 0,1	0,7	NA	-	-
	Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008	9 ± 0,2	4,2	4,5 ± 0,1	2,1	475 ± 1†	220	15*
	Μανδηλαριά λιαστά Σαντορίνης 2007	15 ± 0,6	8,1	27 ± 0,6	14,5	480 ± 2	258	-
	Βηλάνα Σητείας 2009	16 ± 1,2	7,3	15 ± 0,3	6,8	260 ± 1	118	-
	Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007	29 ± 2,7	16,9	9 ± 0,3	5,3	NA	-	-
	Βοϊδόματο Σαντορίνης 2006	33 ± 6,4	16,3	22 ± 0,6	10,9	530 ± 2†	262	19*
	Ασύρτικο Σαντορίνης 2007	33 ± 1,7	18,9	2,5 ± 0,3	1,4	420 ± 5	241	-
	Ασύρτικο Σαντορίνης 2008	35 ± 0,2	13,0	18 ± 0,6	6,7	580 ± 12†	216	18*
	Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006	42 ± 2,3	24,5	11 ± 0,3	6,4	180 ± 1	105	-
Στέμφυλα	Αθήρι Σαντορίνης 2006	60 ± 0,6	33,5	8 ± 0,6	4,5	460 ± 2	257	-
	Ασύρτικο Σαντορίνης 2007	15 ± 1	2,5	4 ± 0,3	0,7	340 ± 6	57	-
	Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006	35 ± 4	7,3	34 ± 1,3	7,1	NA	-	-
Καρποί	Ασύρτικο Ρόδου 2006	75 ± 1	34,9	7 ± 0,2	3,3	650 ± 10†	302	13*
	Μπατίκι Τυρνάβου (υδατικό) 2006	36 ± 3	23,3	>30‡	>19,4	200 ± 1	130	-
	Μανδηλαριά Σαντορίνης (μεθανολικό) 2003	50 ± 7	11,5	200 ± 0,5	44,6	NA	-	-
	Μανδηλαριά Ρόδου 2006	50 ± 2	23,3	>50‡	>23,3	390 ± 1	182	-
	Μανδηλαριά Σαντορίνης (υδατικό) 2003	70 ± 2	14,7	98 ± 1	20,6	480 ± 9	101	-
	Ασύρτικο Σαντορίνης (μεθανολικό) 2003	85 ± 14	7,5	80 ± 3,5	7	NA	-	-
	Ασύρτικο Σαντορίνης 2006	140 ± 5	69	40 ± 4,6	19,7	320 ± 2†	158	48*
Θετικοί μάρτυρες	Ασύρτικο Σαντορίνης (υδατικό) 2003	250 ± 32	15,7	214 ± 1,2	13,5	NA	-	-
		IC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)				
	Αλοπουρινόλη	2,1 ± 0,3		-		-	-	-
	Αζίδιο του νατρίου	-		0,35 ± 0,01		-	-	-

NA: καμία δράση (no activity). TPC: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος). † Εκχυλίσματα που επηρεάζουν την αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης. \* Στατιστικά σημαντική αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης στις συγκεντρώσεις PC<sub>50</sub> συγκριτικά με το control,  $P < 0,05$ . ‡ Εκχυλίσματα που απορροφούν. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

### **3. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ**

#### ***3.1. Η επίδραση της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στην απόδοση των επιμύων***

Η απόδοση μελετήθηκε σε 20 επίμυες, 10 από τους οποίους πήραν φυσιολογικό ορό και 10 το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα δεν επηρέασε την απόδοση καθώς ο χρόνος εξάντλησης ήταν  $46,1 \pm 2,0$  min και  $45,1 \pm 1,4$  min, αντίστοιχα (Εικόνα 57).

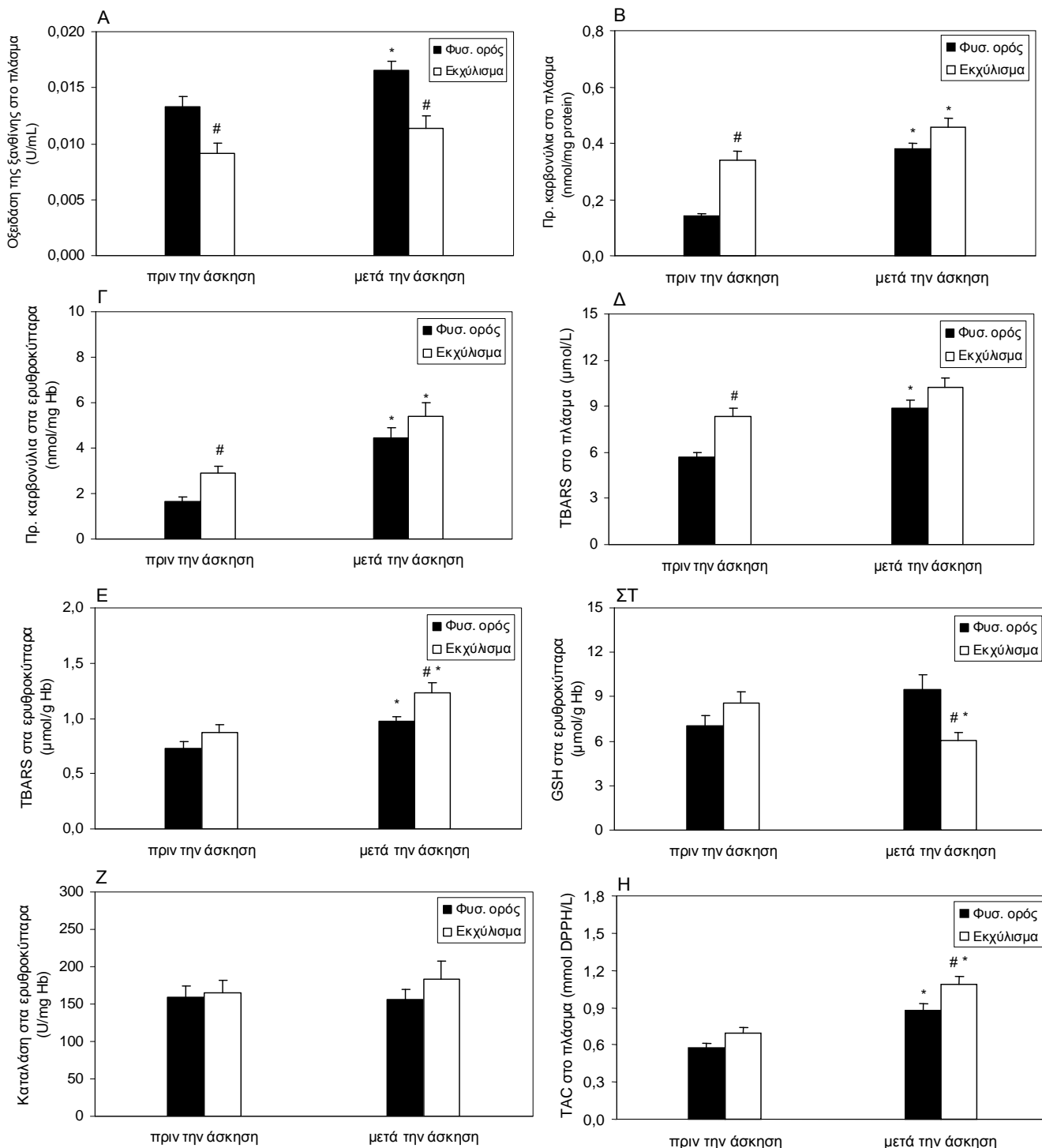


**Εικόνα 57.** Η επίδραση της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στην απόδοση των επιμύων.

#### ***3.2. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στο αίμα των επιμύων.***

Στην ΧΟ στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η άσκηση αύξησε τη δραστηριότητα της ΧΟ, η οποία μειώθηκε με τη χορήγηση του εκχυλίσματος. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο με το εκχύλισμα όσο και χωρίς αυτό. Η αύξηση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια στα

ερυθροκύτταρα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο με το εκχύλισμα όσο και χωρίς αυτό. Η αύξηση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στα TBARS στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε μετά την άσκηση χωρίς το εκχύλισμα. Επίσης, η συγκέντρωση των TBARS ήταν αυξημένη στην ηρεμία στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στην GSH στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η συγκέντρωση της GSH μειώθηκε με το εκχύλισμα μετά την άσκηση. Στην TAC στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Παρατηρήθηκε αύξηση της TAC μετά την άσκηση τόσο μετά τη χορήγηση εκχυλίσματος όσο και μετά τη χορήγηση φυσιολογικού ορού. Στην καταλάση στα ερυθροκύτταρα δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 58).

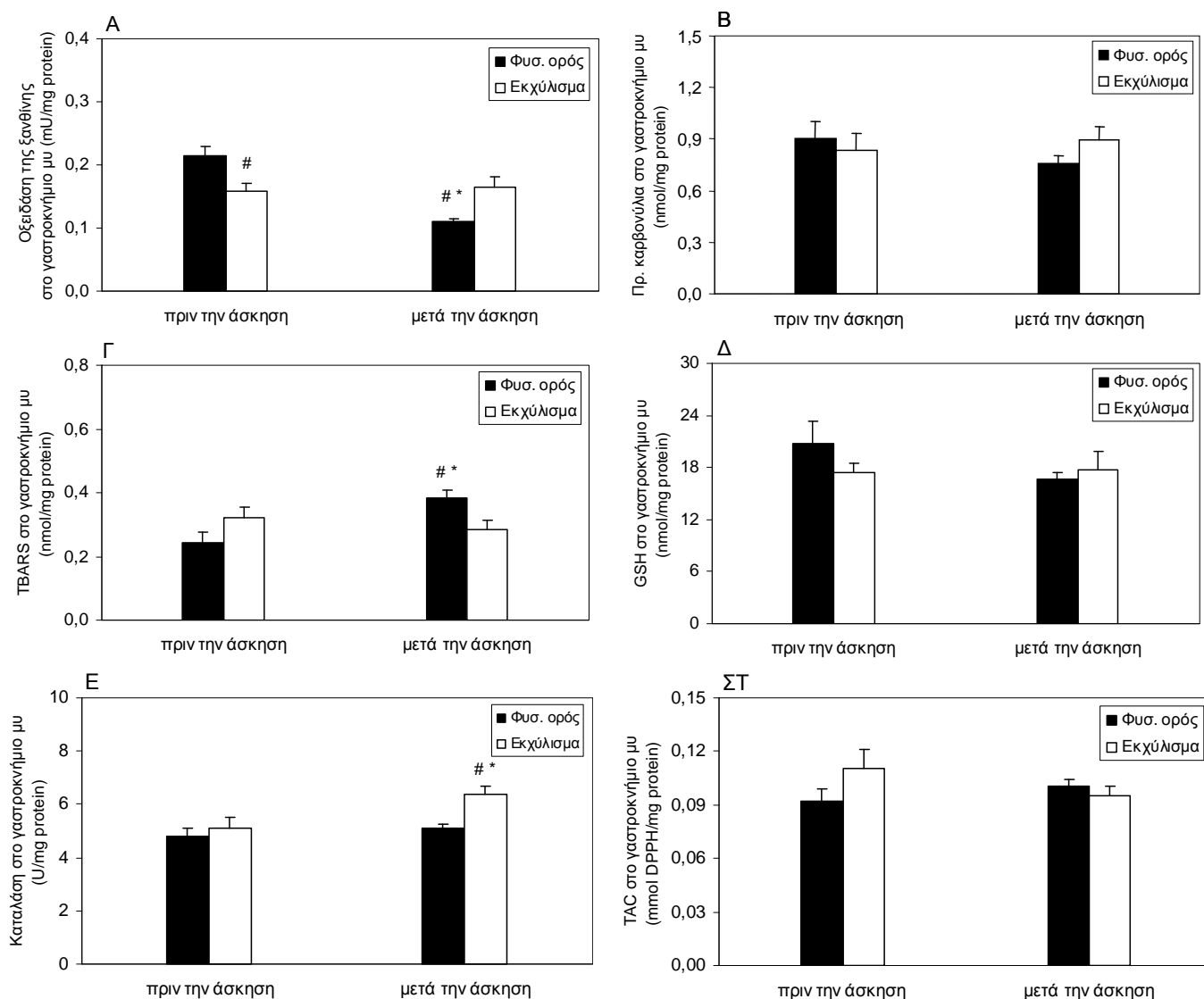


**Εικόνα 58.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).



### ***3.3. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στο γαστροκνήμιο μυ των επιμύων***

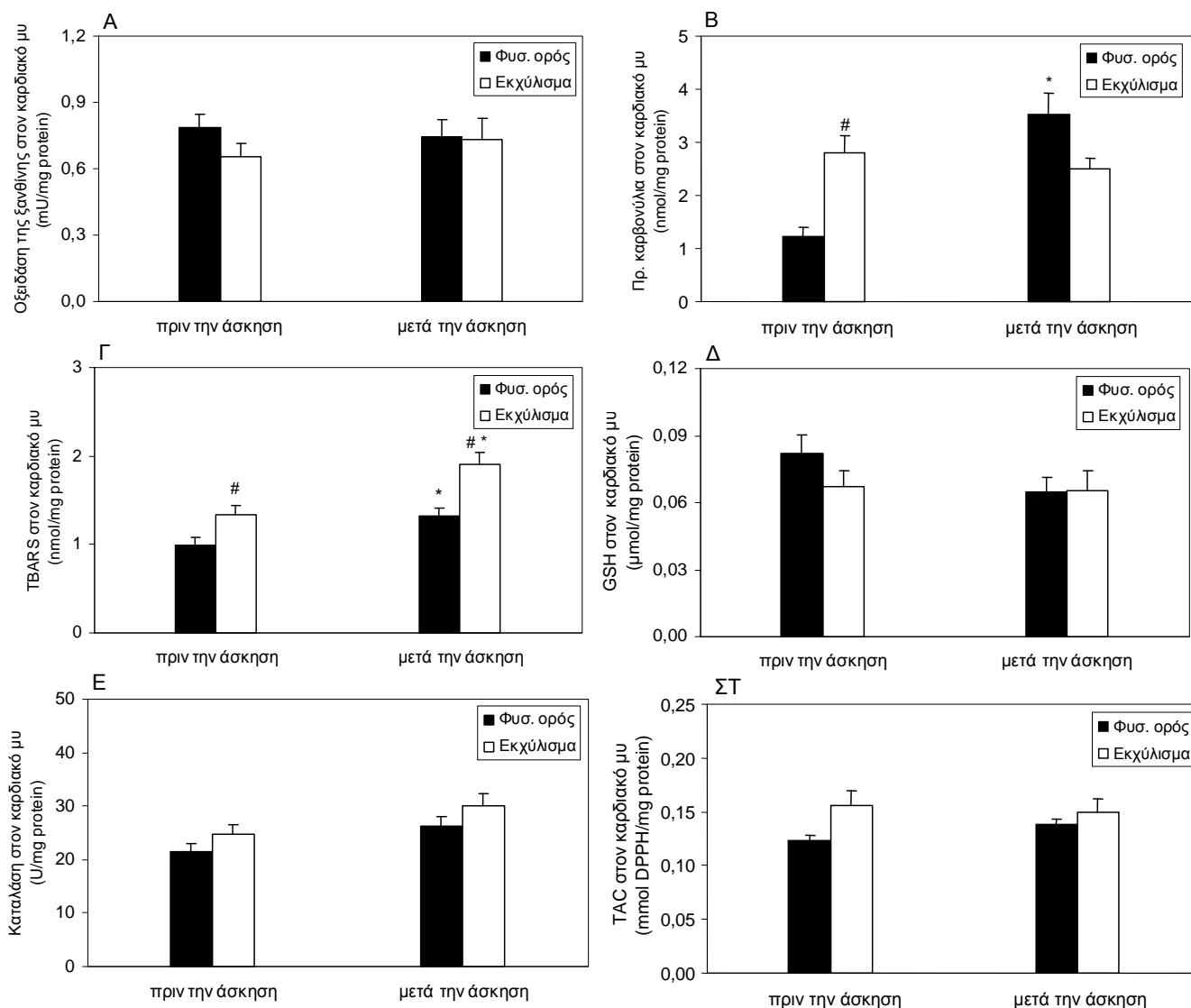
Στην ΧΟ βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η δραστηριότητα της ΧΟ μειώθηκε μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός ενώ ήταν μειωμένη στην ηρεμία στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα. Στα TBARS βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση χρόνου και παρέμβασης. Η συγκέντρωσή τους αυξήθηκε μετά την άσκηση ενώ το εκχύλισμα δεν επηρέασε τη συγκέντρωσή τους. Στην καταλάση βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η δραστηριότητά της αυξήθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, την GSH και την TAC δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 59).



**Εικόνα 59.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

### ***3.4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στον καρδιακό μυ των επιμύων***

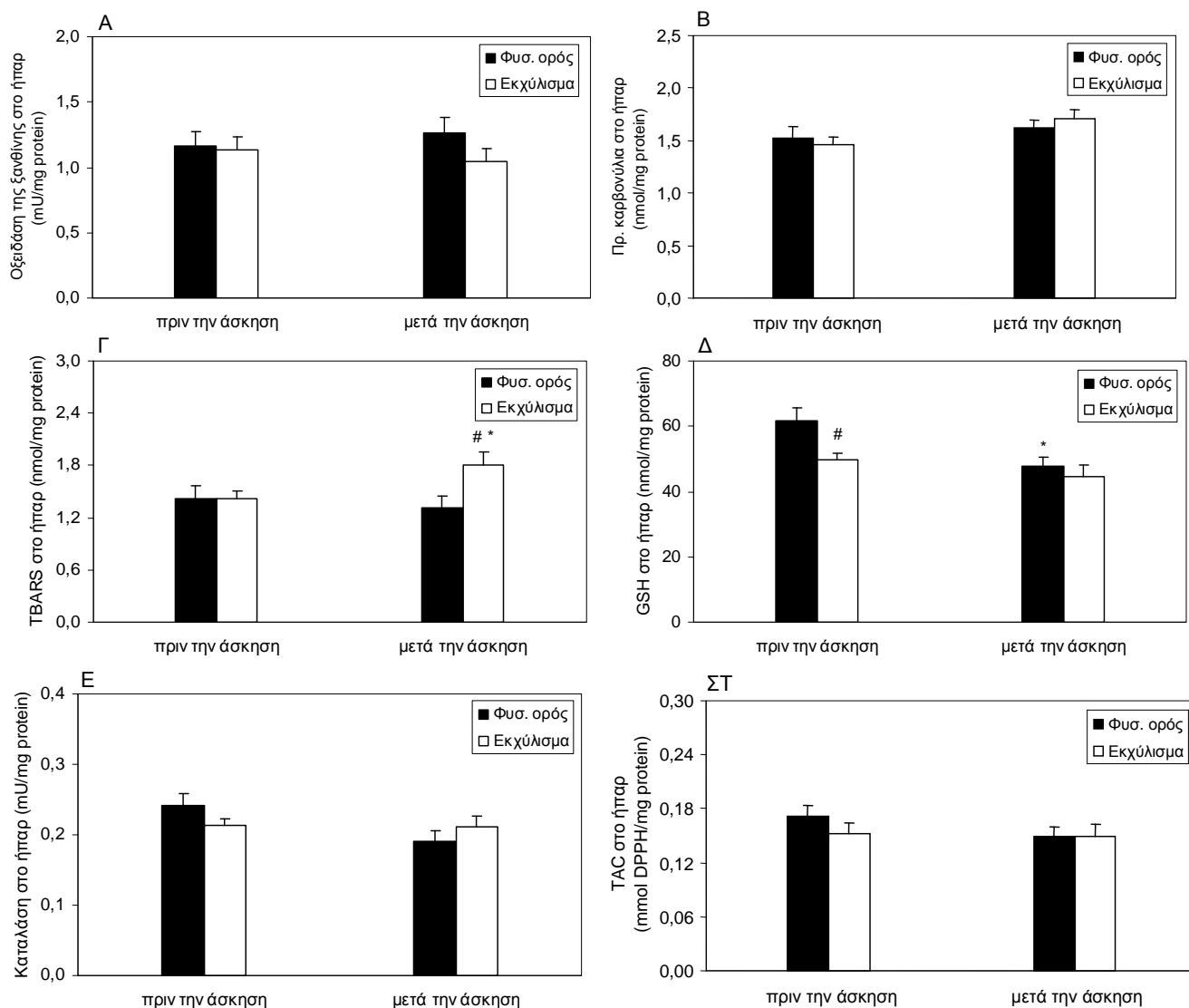
Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Η ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα είχαν αυξημένη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ηρεμία σε σύγκριση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στα TBARS βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε μετά την άσκηση και στις δύο ομάδες. Επίσης, ήταν αυξημένη στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την άλλη ομάδα. Στην καταλάση βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η δραστηριότητα της καταλάσης αυξήθηκε μετά την άσκηση και στις δύο ομάδες. Στην TAC βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η TAC αυξήθηκε στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στην GSH και την XO δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 60).



**Εικόνα 60.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στον καρδιακό μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

### ***3.5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στο ήπαρ των επιμύων***

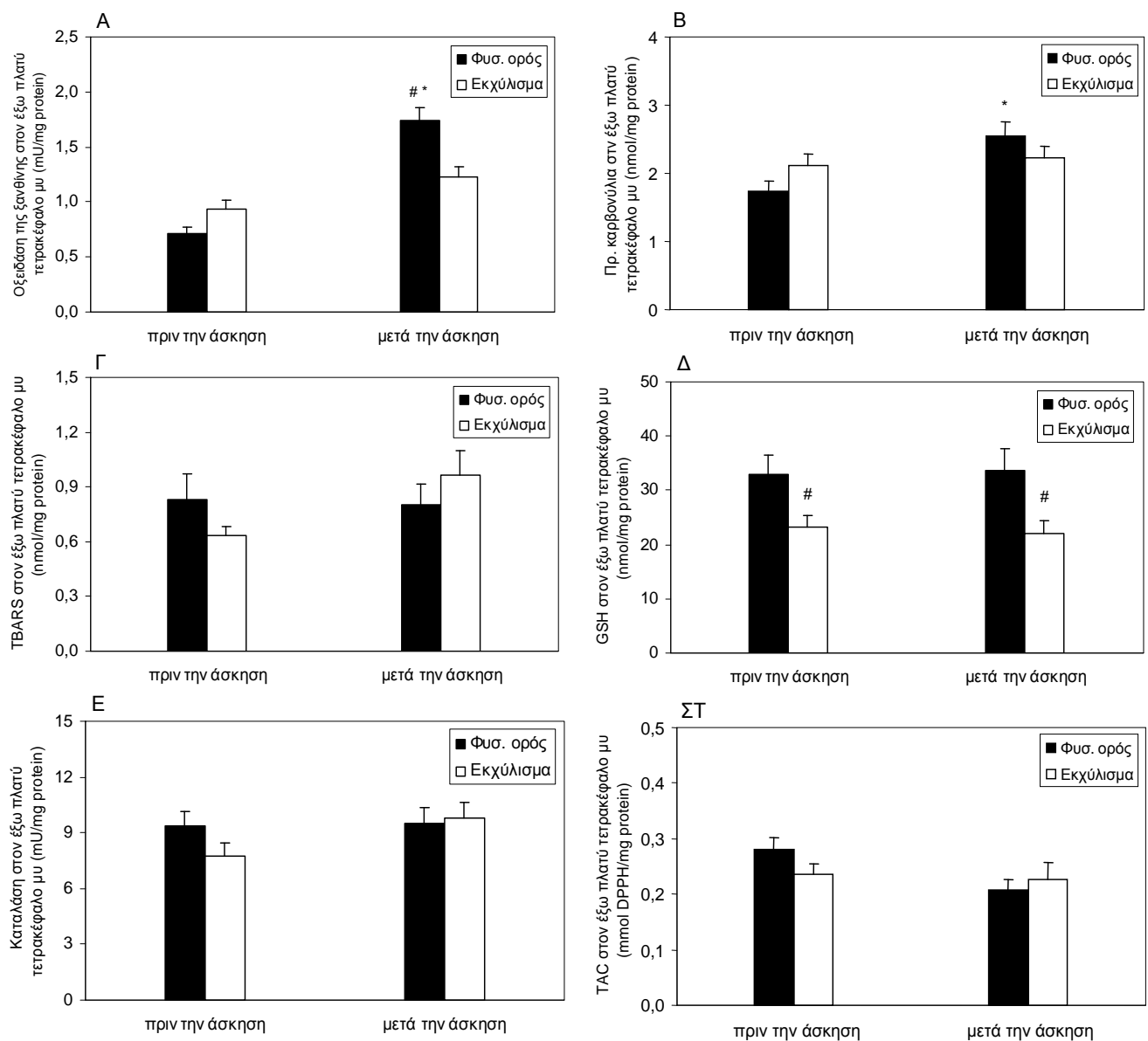
Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η άσκηση αύξησε τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ανεξάρτητα από τη χορήγηση φυσιολογικού ορού ή εκχυλίσματος. Στα TBARS βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα. Στην GSH βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η άσκηση μείωσε τη συγκέντρωση της GSH, η οποία επίσης ήταν μειωμένη λόγω του εκχυλίσματος στην ηρεμία. Στην καταλάση, την TAC και την XO δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 61).



**Εικόνα 61.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο ήπαρ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

### ***3.6. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στο οξειδωτικό στρες στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ των επιμύων***

Στην ΧΟ βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και σημαντική αλληλεπίδραση παρέμβασης και χρόνου. Η δραστηριότητά της αυξήθηκε μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωσή τους στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στην GSH βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η συγκέντρωση της GSH ήταν μειωμένη στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, τόσο στην ηρεμία όσο και μετά την άσκηση. Στην καταλάση, την TAC και τα TBARS δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 62).

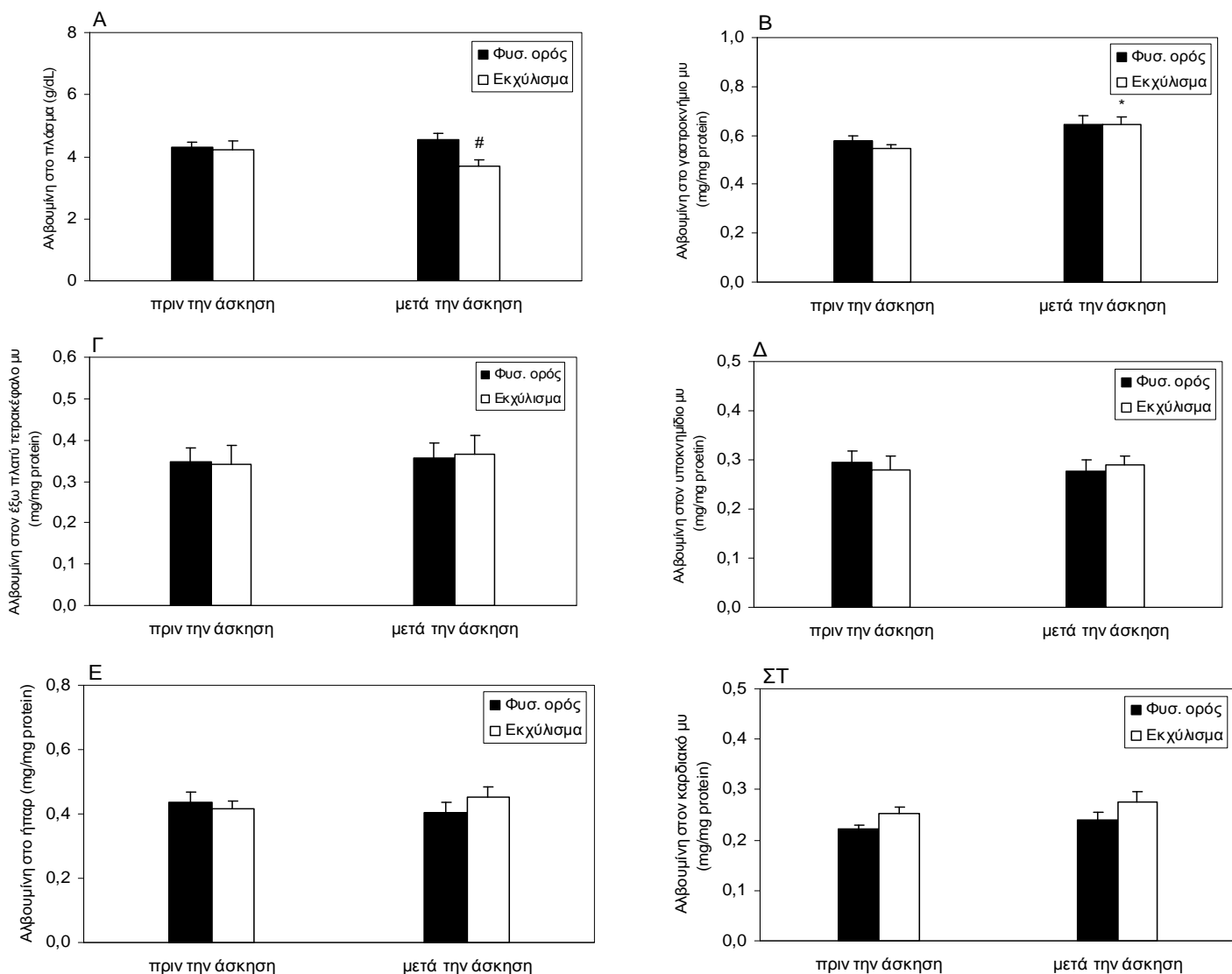


**Εικόνα 62.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).



**3.7. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα, το γαστροκνήμιο μυ, τον υποκνημίδιο μυ, τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ των επιμύων**

Στο πλάσμα βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης μειώθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στο γαστροκνήμιο μυ βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσής της στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα και τάση αύξησής της στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός μετά την άσκηση. Στον καρδιακό μυ βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα που πήρε το εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στο ήπαρ, τον έξω πλατύ τετρακέφαλο και τον υποκνημίδιο μυ δε βρέθηκε καμία επίδραση (Εικόνα 63).



**Εικόνα 63.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα (Α), στο γαστροκνήμιο μυ (Β), τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Γ), τον υποκνημίδιο μυ (Δ), το ήπαρ (Ε) και τον καρδιακό μυ (ΣΤ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0,05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0,05$ ).

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Αντικείμενο της διατριβής αυτής ήταν η κατανόηση του ρόλου της οξειδάσης της ξανθίνης στην άσκηση καθώς και η σημασία της αναστολής της δραστικότητάς της. Η οξειδάση της ξανθίνης αποτέλεσε το αντικείμενο της μελέτης καθώς είναι το κυριότερο ένζυμο παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Αρχικά, η οξειδάση της ξανθίνης ανεστάλη *in vivo* με τη χορήγηση ενός γνωστού συνθετικού αναστολέα της, της αλοπουρινόλης, σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε εξαντλητική αερόβια κολύμβηση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα από σταφύλια αναστέλλουν *in vitro* το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση αλλά και την οξειδάση της ξανθίνης. Σε προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου αναφέρεται ότι τα εκχυλίσματα αυτά είχαν αντιοξειδωτική δράση όταν εξετάστηκαν με διάφορες *in vitro* δοκιμές (εξουδετέρωναν τις ρίζες DPPH, ABTS,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$ ), κάτι όμως που δεν επιβεβαιώθηκε και με τα αποτελέσματα στα προαναφερθέντα ένζυμα. Το εκχύλισμα με τις πιο ισχυρές *in vitro* ιδιότητες επιλέχθηκε και χορηγήθηκε σε επίμυες, που υποβλήθηκαν στο ίδιο πρωτόκολλο εξαντλητικής αερόβιας κολύμβησης. Σκοπός του δεύτερου *in vivo* πειράματος ήταν να εξεταστεί αν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που παρουσίασε το εκχύλισμα *in vitro* ισχύουν και *in vivo* ή αν ο όρος αντιοξειδωτικό είναι εξαρτώμενος από το βιολογικό περιβάλλον, ιδιαίτερα πριν την άσκηση.

Αρχικά χορηγήθηκε αλοπουρινόλη σε επίμυες, οι οποίοι στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε αερόβια εξαντλητική κολύμβηση. Η άσκηση προκάλεσε οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από τις αυξημένες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ. Επιπρόσθετα, η χορήγηση αλοπουρινόλης προκάλεσε, επίσης, οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από τις αυξημένες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ, τη μειωμένη TAC στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ και το μειωμένο λόγο GSH:GSSG στα ερυθροκύτταρα.

Όσον αφορά στις επιδράσεις της άσκησης στο οξειδωτικό στρες, τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες. Η προκαλούμενη από την άσκηση αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ έχουν αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Alessio et al., 2000; Gomez-Cabrera et al., 2005; Stadtman & Levine, 2000; You et al., 2005). Επίσης, η άσκηση αύξησε τη λιπιδική υπεροξείδωση στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ, ιδιότητα που έχει επιβεβαιωθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Alessio et al., 2000; Ajmani et al., 2003;

You et al., 2005). Όπως έχει αναφερθεί, η άσκηση αυξάνει τη συγκέντρωση και το βαθμό ακορεστότητας των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων στο αίμα (Nikolaidis & Mougios, 2004). Φαίνεται ότι η αυξημένη συγκέντρωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο αίμα είναι μία πιθανή αιτία της ευπάθειας των λιπιδίων του πλάσματος στην οξειδωση (Hulbert, 2005). Ο λόγος GSH:GSSG θεωρείται ο κύριος δείκτης εκτίμησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης των ιστών στα ζώα (Mylonas & Kouretas, 1999) και μειώνεται μετά την άσκηση (Aguilo et al., 2005). Η συγκέντρωση της GSH στα ερυθροκύτταρα και της GSSG στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ δεν επηρεάστηκαν από την άσκηση, ένα αποτέλεσμα που έχει επίσης αναφερθεί σε επίμυες μετά από την εφαρμογή ενός πρωτοκόλου (τρέξιμο σε τροχό), που προκαλεί πολύ μικρή μυϊκή καταστροφή όπως και το κολύμπι (Alessio et al., 2005). Ωστόσο, η συγκέντρωση της GSH και ο λόγος GSH:GSSG αυξήθηκαν στο γαστροκνήμιο μυ μετά την άσκηση, πιθανώς ως ένας μηχανισμός απόκρισης του ιστού στο αυξημένο από την άσκηση οξειδωτικό στρες. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία εργασίες όπου η άσκηση είτε δεν προκάλεσε οξειδωτικό στρες (Duthie et al., 1990; Witt et al., 1992; Inoue et al., 1993; Margaritis et al., 1997; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Vider et al., 2001; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009) είτε ακόμα μείωσε το οξειδωτικό στρες σε σχέση με την κατάσταση ηρεμίας, όπως συνέβη και στη διατριβή αυτή με τη συγκέντρωση της GSH και το λόγο GSH:GSSG (Chevion et al., 2003; Inayama et al., 1996; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). Αυτό οφείλεται πιθανά σε διάφορες αιτίες όπως τα διαφορετικά πρωτόκολα άσκησης που εφαρμόστηκαν αλλά και στο γεγονός ότι ορισμένα ενδογενή αντιοξειδωτικά όταν εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες απομακρύνονται ή αδρανοποιούνται με αποτέλεσμα να μην εμφανίζεται αυξημένη η συγκέντρωσή τους μετά την άσκηση.

Ομοίως με μία εργασία των Gomez-Cabrera et al. (2005), που ανέφερε προστατευτική δράση της χορήγησης αλοπουρινόλης στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών του γαστροκνήμιου μυός, η διατριβή αυτή σημειώνει την προστατευτική δράση της χορήγησης αλοπουρινόλης στην οξειδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Ωστόσο, η προστατευτική αυτή δράση της αλοπουρινόλης δεν παρατηρήθηκε και στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν καθώς η χορήγησή της προκάλεσε οξειδωση των πρωτεϊνών στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ των επιμύων. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα τριπλασιάστηκε στην ηρεμία 1,5 h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Η αύξηση αυτή ήταν 2 φορές μεγαλύτερη από την αύξηση, που προκλήθηκε λόγω της άσκησης ή του συνδυασμού αλοπουρινόλης και άσκησης. Δεν επιβεβαιώνεται, έτσι, η αντιοξειδωτική δράση της αλοπουρινόλης, που έχει αναφερθεί στο παρεθλόν (Mills et al., 1997; Gomez-Cabrera et al., 2003, 2005, 2006). Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης περιόρισε την προκαλούμενη από την άσκηση αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG σε επίμυες (Mills et al., 1997; Gomez-Cabrera et al., 2005). Η TAC είναι ένας δείκτης που αντιπροσωπεύει ένα σύνολο αντιοξειδωτικών μορίων με κυριότερα την αλβουμίνη, τη χολερυθρίνη, τις βιταμίνες A, C και E και το ουρικό οξύ, το οποίο μάλιστα συνεισφέρει κατά 58% στο πλάσμα (Wayner et al., 1987). Εξ' ορισμού, η αλοπουρινόλη αναστέλλει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και ουρικό οξύ μειώνοντας τη συγκέντρωσή του. Επομένως, η μειωμένη TAC που παρατηρήθηκε στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ στην ηρεμία μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης αποδίδεται στη μειωμένη συγκέντρωση του ουρικού οξέος. Άμεση συνέπεια της μειωμένης παραγωγής ουρικού οξέος είναι η αύξηση του οξειδωτικού στρες καθώς η αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών αποδυναμώνεται.

Η προέλευση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών, των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξείδωσης και των αντιοξειδωτικών μορίων του πλάσματος είναι εν πολλοίς άγνωστη. Το πλάσμα αλληλεπιδρά με πολλά όργανα και ιστούς και άρα με πολλές πιθανές πηγές ελευθέρων ριζών. Αντίθετα, τα ερυθροκύτταρα είναι λιγότερο διαπερατά και το περιβάλλον τους είναι πιο απομονωμένο και συγκεκριμένο συγκριτικά με το πλάσμα. Αλλά τα ερυθροκύτταρα είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες με κυριότερη την αιμοσφαιρίνη, με αποτέλεσμα να είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση. Δεδομένου ότι δεν μπορούν να πρωτεϊνοσυνθέσουν, αδυνατούν να αντικαταστήσουν τις οξειδωμένες πρωτεΐνες τους (Hebbel & Eaton, 1989). Συμπερασματικά, τόσο η άσκηση όσο και η χορήγηση αλοπουρινόλης προκάλεσαν οξειδωτικό στρες. Δεν επιβεβαιώνεται, έτσι, ο αντιοξειδωτικός ρόλος της αλοπουρινόλης που έχει αναφερθεί στο παρεθλόν αλλά, αντίθετα, φαίνεται ότι έχει οξειδωτικές ιδιότητες.

Επιπλέον, η εργασία αυτή πρώτη αναφέρει μία μεγάλη μείωση στην απόδοση των επιμύων μετά από την αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης. Στην πραγματικότητα, είναι από τις ελάχιστες εργασίες που αναφέρουν πτώση της απόδοσης μετά από χορήγηση μίας ουσίας με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Malm et al., 1997; Marshall et al., 2002). Η κατά 35% πτώση της απόδοσης των επιμύων είναι

πολύ μεγάλη αν αναλογιστεί κανείς ότι προηγούμενες εργασίες έχουν αναφέρει πτώση της απόδοσης το πολύ μέχρι 10% μετά από χορήγηση αντιοξειδωτικών (Marshall et al., 2002). Ακόμα, άλλες επιστημονικές ομάδες που ερεύνησαν τη χορήγηση αλοπουρινόλης πριν την άσκηση δεν έχουν βρει επίδρασή της στην απόδοση ούτε σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999) αλλά ούτε και στον άνθρωπο (Sutton et al., 1980; Gomez-Cabrera et al., 2003; 2006). Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται μερικώς στα διαφορετικά είδη άσκησης που εφαρμόστηκαν, στα διαφορετικά υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και στη διαφορετική συγκέντρωση αλοπουρινόλης που χορηγήθηκε (περίπου 4 mg/kg σωματικού βάρους στον άνθρωπο ή από 32 έως 44 mg/kg σωματικού βάρους σε επίμυες σε αντιπαραβολή με τα 50 mg/kg σωματικού βάρους, που χορηγήθηκαν στην εργασία αυτή).

Για να ελεγχθεί αν η πτώση της απόδοσης έχει μεταβολική αιτία μετρήθηκε το μυϊκό και ηπατικό γλυκογόνο, η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και τα λιπαρά οξέα στο πλάσμα. Εκτός από μία μικρή πτώση της ποσότητας του ηπατικού γλυκογόνου 7,5h μετά τη χορήγηση, η αλοπουρινόλη δε φάνηκε να επηρεάζει κανέναν από τους δείκτες αυτούς. Έτσι, αποκλείστηκε το ενδεχόμενο να επηρεάζει η αλοπουρινόλη το μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων και να μειώνει με αυτό τον τρόπο την απόδοση. Καθώς η αναστολή της δράσης της αλοπουρινόλης οδηγεί τόσο στην αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών όσο και ουρικού οξέος, η πτώση της απόδοσης λόγω της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης φαίνεται να εμπλέκει τις ελεύθερες ρίζες και το ουρικό οξύ στη μυϊκή λειτουργία κατά τη διάρκεια μίας φυσιολογικής διαδικασίας, όπως είναι η κολύμβηση. Ένα σχετικό εύρημα αναφέρεται σε μία πρόσφατη εργασία της επιστημονικής ομάδας των Vina και Gomez-Cabrera, που ασχολήθηκε με τη μελέτη της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης πριν την άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2010). Παρατήρησαν ότι μετά από την αναστολή της παραγωγής  $O_2^{\bullet-}$  από την οξυπουρινόλη σε ποντίκια πριν την άσκηση η δύναμη της μυϊκής συστολής του γαστροκνήμιου μυός ήταν μειωμένη. Έτσι, προτάθηκε ότι τα  $O_2^{\bullet-}$  επιδρούν θετικά στην παραγωγή της μυϊκής δύναμης κατά την άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2010). Ένα άλλο σημαντικό εύρημα είναι η αυξημένη οξειδωτική καταστροφή των ερυθροκυττάρων μετά από τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Το ενδιαφέρον της μελέτης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων έγκειται στο γεγονός ότι επιτελούν την πολύ σημαντική λειτουργία μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς. Έτσι, η αυξημένη οξείδωσή τους που αναφέρθηκε στην

εργασία αυτή πιθανόν να σημαίνει ότι αδυνατούν να επιτελέσουν το ζωογόνο για τους ιστούς ρόλο τους. Η μειωμένη οξυγόνωση των ιστών ίσως να είναι μία πολύ σοβαρή αιτία της πτώσης της απόδοσης των επιμύων μετά από τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Τέλος, έγινε προσπάθεια συσχέτισης και των δεικτών οξειδωτικού στρες με την απόδοση αλλά βρέθηκε ότι εκτός από λίγες εξαιρέσεις (οξειδάση της ξανθίνης του πλάσματος, πρωτεϊνικά καρβονύλια και TBARS του γαστροκνήμιου μυός, λόγος GSH:GSSG στα ερυθροκύτταρα) οι μεταβολές τους δεν αντανακλούν επαρκώς τη διαφορά στην απόδοση.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ορισμένοι δείκτες μετρήθηκαν στο αίμα και σε άλλους ιστούς ώστε να εξεταστούν οι επιδράσεις της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρώνται συχνά σε εργασίες στη βιβλιογραφία με σκοπό την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών ως απόκριση σε διαφορετικά και φαινομενικά ετερόκλητα ερεθίσματα. Ωστόσο, τα ερεθίσματα αυτά έχουν ως κοινό παρονομαστή την ιδιότητά τους να μεταβάλλουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών και τα πιο συχνά εξεταζόμενα είναι η άσκηση (Nikolaidis et al., 2007), η διατροφή (Borai et al., 2007) και η έκθεση σε ξενοβιοτικά (Nandi et al., 2006). Οι περισσότερες σχετικές έρευνες στον άνθρωπο μετρούν τους δείκτες οξειδωτικού στρες σε δείγματα αίματος (Bermejo et al., 2008; Margonis et al., 2007) και λίγες μόνο σε δείγματα από βιοψίες ιστών και κυρίως του σκελετικού μυός (Devries et al., 2008; Rietjens et al., 2007). Ο λόγος είναι ότι η λήψη βιοψίας από ανθρώπινο ιστό μπορεί να συμβεί μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες καθώς είναι μία παρεμβατική και επώδυνη διαδικασία. Επομένως, μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην έρευνα γύρω από το οξειδωτικό στρες στον άνθρωπο είναι να βρεθούν ορισμένοι δείκτες, που όταν μετρώνται στο αίμα αντανακλούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών. Παρότι οι περισσότεροι δείκτες οξειδωτικού στρες έχουν υιοθετηθεί σχετικά πρόσφατα - και ακόμα δεν έχουν πλήρως αξιολογηθεί - δεν είναι σαφές αν τα επίπεδα των δεικτών αυτών στο αίμα αντιπροσωπεύουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών.

Διάφορες εργασίες σε ζώα αναφέρουν παρόμοιες αλλαγές σε δείκτες οξειδωτικού στρες όταν μετρώνται τόσο στο αίμα όσο και σε ιστούς μετά από διάφορες πειραματικές παρεμβάσεις. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε στο πλάσμα και το μυ μετά την άσκηση ενώ η συγκέντρωση της MDA παρέμεινε αμετάβλητη στους δύο αυτούς



ιστούς σε επίμυες (You et al., 2005). Σε μία άλλη μελέτη, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που μετρήθηκαν στο πλάσμα, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τον καρδιακό και το σκελετικό μυ δε μεταβλήθηκαν μετά την άσκηση σε επίμυες (Liu et al., 2000). Επίσης, η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε στο πλάσμα και το σκελετικό μυ μετά την άσκηση σε άλογα (Kinnunen et al., 2005). Η συγκέντρωση των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που μετρήθηκε στο πλάσμα και το ήπαρ επιμύων μεταβλήθηκε προς την ίδια κατεύθυνση μετά από διατροφή πλούσια σε σουκρόζη και φτωχή σε μαγνήσιο (Boparai et al., 2007), ενώ η συγκέντρωση της MDA και η δραστηριότητα της καταλάσης στο αίμα, το ήπαρ και τον νεφρό επηρεάστηκαν παρόμοια από τη χορήγηση αρσενικού σε επίμυες (Nandi et al., 2006).

Με βάση τα δεδομένα των προηγούμενων εργασιών, φαίνεται ότι οι δείκτες οξειδωτικού στρες μεταβάλλονται προς την ίδια κατεύθυνση στο αίμα και τους ιστούς. Αυτό σημαίνει ότι οι αλλαγές που ανιχνεύονται στους δείκτες του αίματος πιθανόν να αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές στην αντιοξειδωτική κατάσταση ορισμένων ιστών, όπως του σκελετικού μυός, του καρδιακού μυός ή του ήπατος. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής μετρήσαμε συγκεκριμένους δείκτες οξειδωτικού στρες μετά την εφαρμογή δύο παρεμβάσεων, που επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση και πιο συγκεκριμένα την άσκηση και τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η εξαντλητική άσκηση σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Finaud et al., 2006) και μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα φυσιολογικό μοντέλο για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες (Kyparos et al., 2007). Η άσκηση προκαλεί φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές στο αίμα, οι οποίες τελικά επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική του κατάσταση. Μερικά καλά μελετημένα φαινόμενα, που εμφανίζονται στο αίμα κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι η αύξηση της θερμοκρασίας, η μείωση του pH και της μερικής πίεσης του οξυγόνου και η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος (Nikolaidis & Jamurtas, 2009). Όλοι αυτοί οι παράγοντες που μεταβάλλουν την ομοιόσταση αλλάζουν και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του αίματος. Είναι γεγονός ότι η υπερθερμία αυξάνει τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών στη σπλαχνική κυκλοφορία των επιμύων (Hall et al., 1994). Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών φαίνεται να εξαρτάται και από το pH. Πιο συγκεκριμένα, σε πειράματα αλλαγής του pH μεταξύ 6-8, που έγιναν σε μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της αναπνοής φάνηκε ότι η αύξηση του pH αύξησε την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Selivanov et al., 2008). Σε υποξικούς ιστούς, όπου δηλαδή η μερική πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή, η δεϋδρογονάση της ξανθίνης μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης (Nishino et al.,

2008). Κατά την επανοξυγόνωση σχηματίζεται  $O_2^{\cdot-}$  μέσω μίας αντίδρασης ανάμεσα στο οξυγόνο, την υποξανθίνη και την ξανθίνη, η οποία καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης (Nishino et al., 2008). Επίσης, έχειδειχτεί ότι το γαλακτικό οξύ εξουδετερώνει τις  $OH^{\cdot-}$  και  $O_2^{\cdot-}$  (Groussard et al., 2000). Από την άλλη, η αλοπουρινόλη είναι αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (Kelley & Beardmore, 1970) χωρίς όμως ο ακριβής της ρόλος να έχει αποσαφηνιστεί. Έτσι, ενώ αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διατριβή αυτή αναφέρουν ότι η χορήγησή της προκαλεί οξειδωτικό στρες, υπάρχουν και εργασίες που υποστηρίζουν ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό (Gomez-Cabrera et al., 2005; 2003). Όλες όμως οι σχετικές έρευνες συμφωνούν ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών. Επομένως, μία πιθανή αλλαγή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση λόγω της άσκησης ή της χορήγησης αλοπουρινόλης ίσως να μπορούσε να απεικονιστεί από αλλαγές σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα ή/και τους ιστούς.

Μετά από τη στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε βρέθηκε ότι συγκεκριμένοι δείκτες οξειδωτικού στρες όταν μετρώνται στο αίμα απεικονίζουν επαρκώς τις μεταβολές στο οξειδωτικό στρες στο σκελετικό μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ είτε στην ηρεμία είτε μετά την εφαρμογή παρεμβάσεων, που επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών. Η καταλληλότητα ενός δείκτη οξειδωτικού στρες του αίματος ώστε να χρησιμοποιηθεί και για την απεικόνιση της κατάστασης των ιστών δε φαίνεται να εξαρτάται από το είδος της παρέμβασης και το χρόνο. Αντίθετα, τα αποτελέσματα ήταν εξαρτώμενα των ιστών καθώς κάθε δείκτης, εκτός της GSSG, περιγράφει την οξειδοαναγωγική κατάσταση συγκεκριμένων ιστών και όχι όλων. Πιο συγκεκριμένα, η GSSG των ερυθροκυττάρων είναι ο καλύτερος δείκτης για την περιγραφή του οξειδωτικού στρες του σκελετικού μυός, του καρδιακού μυός και του ήπατος. Μεταξύ των ιστών, ο καρδιακός μυς είναι εκείνος που απεικονίζεται πλήρως στο αίμα. Η οξειδάση της ξανθίνης και τα TBARS μπορούν να περιγράψουν ικανοποιητικά το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του καρδιακού μυός και του ήπατος ενώ τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, η GSH και η καταλάση αντανακλούν την κατάσταση του σκελετικού και του καρδιακού μυός. Η συχνά μετρούμενη TAC (Fabian et al., 2007; Song et al., 2007) και ο λόγος GSH:GSSG (Tanguy et al., 2004; Tian et al., 2007) δε φαίνεται να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες προς την κατεύθυνση αυτή.

Το αίμα περιέχει διάφορα συστατικά, τα οποία θεωρούνται δείκτες οξειδωτικού στρες (π.χ., TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια). Οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των δεικτών αυτών στο αίμα υποτίθεται ότι αντικατοπτρίζουν

αντίστοιχες αλλαγές τους σε διάφορους ιστούς. Στο πεδίο της βιοχημείας της άσκησης ο ιστός, ο οποίος ενδιαφέρει τις περισσότερες έρευνες είναι ο σκελετικός μυς. Επομένως, τα συμπεράσματα που βγαίνουν από τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες στο αίμα υποτίθεται ότι αφορούν τους σκελετικούς μύες. Η μόνη εργασία που εφάρμοσε στατιστικές μεθόδους για τον έλεγχο της πιθανότητας το αίμα να μπορεί να προσφέρει μία ικανοποιητική εικόνα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ιστού (π.χ. συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα σε δείκτες στο αίμα και διάφορους ιστούς) είναι αυτή των Argüelles et al. (2004). Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των TBARS, των υδροϋπεροξειδίων και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και η TAC στον ορό, το ήπαρ, τον σπλήνα, την καρδιά και τον νεφρό επιμύων, των οποίων η διατροφή ήταν πλούσια σε παράγοντες που μεταβάλλουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση (π.χ. σίδηρος). Τα αποτελέσματά τους δεν έδειξαν σημαντική συσχέτιση για τα TBARS ανάμεσα στον ορό και τους ιστούς, ενώ τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων του ορού συσχετίστηκαν με άλλους ιστούς. Αντίθετα, βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα πρωτεϊνικά καρβονύλια του ορού και του καρδιακού μυός, ενώ η TAC δεν παρουσίασε καμία σημαντική συσχέτιση. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην εργασία αυτή δε μετρήθηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες στο σκελετικό μυ με αποτέλεσμα να είναι δυνατές οι συγκρίσεις της δικής μας εργασίας μόνο σε ό,τι αφορά το ήπαρ και τον καρδιακό μυ. Μετά από μία τέτοια σύγκριση συμπεραίνει κανείς ότι τα ευρήματά μας σχετικά με τα TBARS δε συμφωνούν, τα αποτελέσματά μας όμως σχετικά με τα καρβονύλια συμφωνούν μερικώς και τα αποτελέσματα της TAC πλήρως με την έρευνα των Argüelles et al., (2004). Μία πιθανή αιτία για αυτή την ασυμφωνία είναι οι διαφορετικές παρεμβάσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Όπως προαναφέρθηκε, δεν υπάρχουν πολλές εργασίες που να εξετάζουν αν οι δείκτες που μετρώνται στο αίμα αντανακλούν την οξειδοαναγωγική ικανότητα των ιστών. Έτσι, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από τη μελέτη της τάσης μεταβολής των δεικτών οξειδωτικού στρες μετά από διαφορετικές παρεμβάσεις στις υπάρχουσες εργασίες. Γενικά, τα δεδομένα των εργασιών αυτών ενισχύουν τα δικά μας αποτελέσματα καθώς αναφέρουν ότι οι αλλαγές των δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και τους ιστούς είναι προς την ίδια κατεύθυνση. Πράγματι, σε μία εργασία τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν μετά την άσκηση στο αίμα και τους ιστούς επιμύων (You et al., 2005) ενώ πτώση της GSH παρατηρήθηκε στο πλάσμα, το ήπαρ, τον νεφρό και το σκελετικό μυ επιμύων (Leeuwenburgh & Ji, 1995). Σε άλλη

εργασία, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στο ήπαρ και τον εγκέφαλο ήταν αυξημένα σε επίμυες ηλικίας 24 μηνών σε σύγκριση με νεαρότερους επίμυες ηλικίας 6 μηνών (Tian et al., 1998). Επιπρόσθετα, μία σχετιζόμενη με την ηλικία αύξηση της MDA, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της GSSG παρατηρήθηκε στα μιτοχόνδρια του εγκεφάλου και του καρδιακού μυός επιμύων (Cocco et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στο ότι διαφορετικές πειραματικές επιδράσεις μπορεί να έχουν, τουλάχιστον ποιοτικά, παρόμοιες επιδράσεις στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες όταν αυτοί μετρώνται στο αίμα και τους ιστούς.

Αυτή είναι η πρώτη εργασία που εκτίμησε στατιστικά τη σχέση ανάμεσα σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα και τους ιστούς μετά από φυσιολογικά ερεθίσματα, όπως η άσκηση. Επίσης, είναι η πρώτη που περιλαμβάνει σε μια τέτοια στατιστική μελέτη το σκελετικό μυ, ο οποίος θεωρείται ο κύριος ιστός παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης (Bailey et al., 2004). Στην πλειοψηφία των σχετικών με άσκηση εργασιών συλλέχθηκαν μόνο δείγματα αίματος κάνοντας την υπόθεση ότι οι μετρήσεις στο αίμα περιγράφουν την κατάσταση και στο μυϊκό ιστό. Παρά το γεγονός ότι αυτή η υπόθεση μοιάζει λογική, καμία εργασία δεν την εξέτασε ενδελεχώς. Με βάση τα αποτελέσματά μας, φαίνεται ότι η υπόθεση αυτή ισχύει για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια του πλάσματος και την GSH, την GSSG και την καταλάση των ερυθροκυττάρων ενώ η οξειδάση της ξανθίνης, τα TBARS, ο λόγος GSH:GSSG και η TAC δε φαίνεται να απεικονίζουν επαρκώς την οξειδοαναγωγική κατάσταση του σκελετικού μυός όταν μετρώνται στο αίμα.

Αναφορικά με τα διαφορετικά τμήματα του αίματος που εξετάστηκαν (πλάσμα και ερυθροκύτταρα), παρατηρήθηκαν πολύ υψηλές, σχεδόν τέλειες συσχετίσεις μεταξύ τους. Καθίσταται, λοιπόν, σαφές ότι υπάρχει επικοινωνία μεταξύ τους τουλάχιστον για τα προϊόντα της οξείδωσης των πρωτεϊνών και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Φαίνεται ότι η μέτρησή τους στο πλάσμα αρκεί για να περιγραφούν οι αλλαγές τους και στα ερυθροκύτταρα. Το πλάσμα αλληλεπιδρά με όλα τα όργανα και τους ιστούς, με πολλές δηλαδή πιθανές πηγές ελευθέρων ριζών. Αντίθετα, τα κύτταρα του αίματος είναι λιγότερο διαπερατά κι έτσι το περιβάλλον τους μπορεί να είναι πιο ελεγχόμενο από αυτό του πλάσματος. Τα ερυθροκύτταρα έχουν πολύ απλή δομή καθώς αποτελούνται από μία μεμβράνη, που περιβάλλει ένα διάλυμα αιμοσφαιρίνης (Murray, 2003). Σήμερα, ο ρόλος των ερυθροκυττάρων εκτιμάται ολοένα και περισσότερο πέρα από τη συμμετοχή τους στη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Μάλιστα, υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν τη

συνεισφορά των ερυθροκυττάρων στη διατήρηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μορίων της κυκλοφορίας (Buehler & Alayash, 2005). Παρά την απουσία μιτοχονδρίων από τα ερυθροκύτταρα, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς κυρίως λόγω της υψηλής πίεσης του  $O_2$  στο αρτηριακό αίμα και της παρουσίας του σιδήρου της αίμης σε αυτά (Cimen, 2008). Η κυριότερη πηγή ελευθέρων ριζών στα ερυθροκύτταρα φαίνεται να είναι η αιμοσφαιρίνη, η οποία μεταφέρει οξυγόνο και αυτοοξειδώνεται με αποτέλεσμα να παράγεται  $O_2^{\bullet-}$ . Αφού η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα είναι 5 mM, ακόμα και χαμηλά επίπεδα αυτοοξειδωσής της μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης της ρίζας  $O_2^{\bullet-}$  σε σημαντικά επίπεδα (Cimen, 2008). Παρά το γεγονός ότι το  $O_2^{\bullet-}$  είναι σχετικά αδρανές οξειδωτικό (Powers & Jackson, 2008), είναι υπόστρωμα (μαζί με το  $H_2O_2$ ) στην αντίδραση Haber-Weiss που καταλύεται από το σίδηρο και παράγει τις πιο δραστικές ρίζες  $OH^{\bullet}$ .

Οι ελεύθερες ρίζες που κυκλοφορούν στο πλάσμα μπορεί να επηρεάσουν τα συστατικά των ερυθροκυττάρων. Αυτό έχει δείχτει από εργασίες που βρήκαν αυξημένη οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων μετά από οξεία άσκηση στα ερυθροκύτταρα (Senturk et al., 2005). Η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (συμπεριλαμβανομένου και του σκελετού τους) αποτελείται από πρωτεΐνη κατά 50%, το 75% της οποίας είναι σπεκτρίνη (Delaunay et al., 1990). Πάνω από το 95% της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης τους είναι αιμοσφαιρίνη (Cimen, 2008). Έτσι, φαίνεται ότι για την πρωτεϊνική οξείδωση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων ευθύνεται η σπεκτρίνη και του κυτταροπλάσματος η αιμοσφαιρίνη.

Όσον αφορά στα λιπίδια των ώριμων ερυθροκυττάρων, όλα βρίσκονται στη μεμβράνη. Αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και, καθώς τα ερυθροκύτταρα δεν έχουν οργάνidia, η γλυκόζη είναι το μόνο ενεργειακό υπόστρωμα που χρησιμοποιούν (Cimen, 2008). Τα λιπαρά οξέα διαφέρουν ως προς την ευπάθειά τους στην οξείδωση (Hulbert, 2005). Παρόλο που έχει προταθεί ότι ο ρυθμός οξείδωσης των PUFA δε σχετίζεται με το βαθμό ακορεστότητάς τους (Visioli et al., 1998), οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι τα PUFA είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση από τα μονοακόρετα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (Hulbert, 2005; Visioli et al., 1998). Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων περιέχουν σημαντικές ποσότητες PUFA, που κυμαίνονται από 28% έως 37% της συνολικής ποσότητας λιπαρών οξέων (Lemaitre et al., 2008; Wilhelm et al., 2008) με αποτέλεσμα να είναι ευπαθή στην οξείδωση. Δε γνωρίζουμε εργασίες που να έχουν μετρήσει λιπιδική υπεροξείδωση

στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μετά την άσκηση. Το ενδιαφέρον σε τέτοιες μετρήσεις έγκειται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες παραμορφώνει το σχήμα των ερυθροκυττάρων επηρεάζοντας την ικανότητά τους να μεταφέρουν οξυγόνο και NO<sup>•</sup> στους ιστούς (Bateman et al., 2001; Betticher et al., 1995). Αυτό είναι σημαντικό διότι υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων μετά από χρόνια άσκηση (Nikolaidis & Mougios, 2004).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής μπορούν να χρησιμεύσουν ως μία κατευθυντήρια γραμμή που θα βοηθήσει στο σχεδιασμό πειραμάτων στο πεδίο της βιολογίας των ελευθέρων ριζών. Βέβαια, αυτό είναι ένα προκαταρκτικό βήμα κατανόησης της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στη βιολογική λειτουργία μετά από πειραματικές παρεμβάσεις. Τα ευρήματα αυτά μοιάζουν έγκυρα τόσο στην ηρεμία όσο και μετά από παρεμβάσεις ικανές να αλλάξουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ιστών. Τελικά, ορισμένοι δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως, αν μετρηθούν στο αίμα μπορούν να προσφέρουν αξιόπιστες ενδείξεις σχετικά με τις βιολογικές μεταβολές που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στους ίδιους δείκτες στο σκελετικό μυ, τον καρδιακό μυ και το ήπαρ. Ως τώρα είναι φανερό ότι τα κύτταρα του πλάσματος και του αίματος παράγουν σημαντικές ποσότητες ελευθέρων ριζών και περιέχουν υποστρώματα, τα οποία μπορούν να οξειδωθούν. Έτσι, είναι προφανές ότι το οξειδωτικό στρες και η οξειδωτική καταστροφή που μετρώνται στο αίμα μετά την άσκηση ή άλλη πειραματική παρέμβαση προέρχονται, τουλάχιστον μερικώς, από το αίμα.

Όσον αφορά στην οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών εξετάστηκε η αλβουμίνη στην προσπάθεια εύρεσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, στις οποίες οφείλεται η προκαλούμενη από την άσκηση πρωτεϊνική οξείδωση. Επίσης, υποθέσαμε ότι η συγκέντρωση της μονομερούς αλβουμίνης αλλά και της διμερούς, οξειδωμένης της μορφής στους σκελετικούς μύες θα μπορούσε να μεταβληθεί ως απόκριση σε παρεμβάσεις, που επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής, μετρήσαμε τη συγκέντρωση της αλβουμίνης σε ορισμένους ιστούς μετά την εφαρμογή δύο τέτοιων παρεμβάσεων (άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης).

Η αλβουμίνη συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ένα μέρος της αλβουμίνης συντίθεται και στους σκελετικούς μύες των επιμύων (Yamada et al., 1984). Επομένως, οποιαδήποτε αλλαγή στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο σκελετικό μυ θα μπορούσε να προσφέρει πληροφορίες για τη σύνθεση, τη μεταφορά

και την πιθανή αντιοξειδωτική λειτουργία της. Πολλές εργασίες έχουν μελετήσει τις επιδράσεις διαφορετικών παρεμβάσεων στη συγκέντρωση της αλβουμίνης του πλάσματος σε πειραματόζωα ή στον άνθρωπο (Goldwasser & Feldman, 1997; Szapacs et al., 2006; Lamprecht et al., 2009). Ωστόσο, υπάρχουν λίγες εργασίες που να εξετάζουν την αλβουμίνη σε ιστούς πέραν του αίματος (Wagatsuma & Yamada, 2000; Wagatsuma et al., 2001, 2002). Δεν υπάρχουν, όμως, εργασίες που μετρούν τη συγκέντρωση της αλβουμίνης μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης, δύο ερεθισμάτων που όπως φάνηκε παραπάνω προκαλούν οξειδωτικό στρες. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης υπολογίστηκε φωτομετρικά στους ταχείας συστολής μύες EDL και γαστροκνήμιο, στο βραδείας συστολής υποκνημίδιο μυ, στον καρδιακό μυ και το ήπαρ. Επιπλέον, η μονομερής και η οξειδωμένη/διμερής αλβουμίνη υπολογίστηκαν με ανάλυση western στον EDL.

Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης μετά την άσκηση και στους 3 σκελετικούς μύες που εξετάστηκαν. Αντίθετα, η συγκέντρωση της αλβουμίνης μειώθηκε στον καρδιακό μυ 5 h μετά την άσκηση και δε μεταβλήθηκε στο ήπαρ. Επίσης, φαίνεται ότι η αλοπουρινόλη δεν επηρεάζει τα επίπεδα της αλβουμίνης στους ιστούς. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στον EDL μετά την άσκηση επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση western. Με τη μέθοδο αυτή βρέθηκε αύξηση τόσο στη μονομερή όσο και στη διμερή αλβουμίνη. Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της αλβουμίνης στους σκελετικούς μύες μετά την άσκηση θα μπορούσε να αποδοθεί στις αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις για μόρια, που παρέχουν ενέργεια στο κύτταρο. Έχει, για παράδειγμα, προταθεί ότι η αλβουμίνη συμμετέχει στη μεταφορά λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες και τον καρδιακό μυ (Luiken et al., 1999). Ωστόσο, εμείς υποθέτουμε ότι η αύξηση αυτή είναι κυρίως μία απόκριση στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες. Ένας σημαντικός αριθμός εργασιών έχει δείξει ότι η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες στο αίμα, τον EDL, το γαστροκνήμιο και τον υποκνημίδιο μυ (McArdle et al., 1999; You et al., 2005; Nikolaidis et al., 2006). Οι σκελετικοί μύες των πίσω ποδιών των επιμύων συμμετέχουν περισσότερο στο κούμπι και γι' αυτό είναι πιο επιρρεπείς στην οξειδωτική καταστροφή που προκαλεί η άσκηση. Ο αντιοξειδωτικός αμυντικός μηχανισμός των σκελετικών μυών ενεργοποιείται για την αντιμετώπιση των δυσμενών επιδράσεων της εξαντλητικής άσκησης.

Η αλβουμίνη είναι ένα μόριο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης που υπάρχουν στο μόριό της αποτελούν το 80% της ολικής ποσότητας

θειολών του πλάσματος κι έτσι, πιστεύεται ότι η αλβουμίνη εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες μέσω της σουλφυδρυλομάδας στη θέση Cys-34 (Gutteridge, 1986). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν εργασίες σχετικά με τις επιδράσεις της άσκησης στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της αλβουμίνης του ορού (Imai et al., 2002; Lamprecht et al., 2008, 2009). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η άσκηση αύξησε την οξειδωμένη αλβουμίνη του ορού (Imai et al., 2002) και μάλιστα ότι η οξειδωτική τροποποίηση του μορίου της είναι εξαρτώμενη από την ένταση της άσκησης (Lamprecht et al., 2008, 2009). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την αύξηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης που παρατηρήσαμε στους σκελετικούς μύες. Έχει, επίσης, προταθεί ότι η οξείδωση της αλβουμίνης του ορού (Lamprecht et al., 2009) αλλά και τα επίπεδα των θειολών (Quinlan et al., 1994) είναι δείκτες οξειδωτικού στρες. Είναι όμως δύσκολη η εκτίμηση του οξειδωτικού στρες με βάση τις χαμηλού μοριακού βάρους θειόλες διότι είναι επιρρεπείς στην οξειδωτική καταστροφή με αποτέλεσμα η μέτρησή τους ειδικά στο αίμα να μην είναι εύκολη. Αντίθετα, είναι πιο αποτελεσματική η μέτρηση σταθερών ομάδων οξειδωμένων θειολών, όπως τα διμερή της αλβουμίνης (Ogasawara et al., 2006). Η διμερής αλβουμίνη σχηματίζεται στο αίμα μετά από έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες όπως ο περοξυνιτρίτης (Scorza & Minetti, 1998) και το *tert*-BOOH (τεταρτοταγές βουτυλδροϋπεροξείδιο) (Ogasawara et al., 2006). Ακόμα, έχει βρεθεί αυξημένη συγκέντρωση της διμερούς αλβουμίνης στο πλάσμα ασθενών που κάνουν αιμοκάθαρση λόγω παθήσεων των νεφρών, οι οποίες προκαλούν οξειδωτικό στρες (Ogasawara et al., 2006). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αυξημένα επίπεδα διμερούς αλβουμίνης που βρήκαμε μετά την άσκηση, η οποία προάγει το οξειδωτικό στρες. Το ποσοστό αύξησης της διμερούς αλβουμίνης ήταν υψηλότερο από αυτό της μονομερούς με αποτέλεσμα η αύξηση αυτή να μην είναι μια απλή συνέπεια της αυξημένης αλβουμίνης. Φαίνεται να ισχυροποιείται, λοιπόν, η αρχική μας υπόθεση που υποστηρίζει ότι τα διμερή της αλβουμίνης πιθανόν να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης οξειδωτικού στρες (Ogasawara et al., 2006). Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την επιβεβαίωση του ρόλου της διμερούς αλβουμίνης. Παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε μετά την άσκηση στους 3 σκελετικούς μύες, η επίδραση της άσκησης στον καρδιακό μυ και το ήπαρ ήταν διαφορετική. Πιο συγκεκριμένα στον καρδιακό μυ τα επίπεδα της αλβουμίνης αυξήθηκαν ενώ στο ήπαρ δε μεταβλήθηκαν, όπως συνέβη και μετά τη χορήγηση αλλοπουρινόλης. Υποθέτουμε ότι η αλβουμίνη συμμετέχει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των σκελετικών μυών σε μεγαλύτερο



βαθμό σε σχέση με το ήπαρ ή τον καρδιακό μυ καθώς οι σκελετικοί μύες συμμετέχουν πιο άμεσα στο κολύμπι.

Η σύνθεση της αλβουμίνης συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ και μετά εκκρίνεται στην κυκλοφορία και μεταφέρεται στους ιστούς. Ωστόσο, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αλβουμίνη εκφράζεται και στους σκελετικούς μύες των τρωκτικών (Yamada et al., 1984; Wagatsuma et al., 2001). Έτσι, η αυξημένη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον EDL και τον υποκνημίδιο μυ 5 h μετά την άσκηση θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα τόσο εισαγωγής της αλβουμίνης στους ιστούς όσο και αυξημένης σύνθεσής της.

Όσον αφορά στην αλοπουρινόλη, τα επίπεδα της αλβουμίνης δεν επηρεάστηκαν μετά τη χορήγηση στους ιστούς που μελετήθηκαν. Η αλοπουρινόλη λόγω της αναστολής της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης έχει διπλό ρόλο (αναστέλλει την παραγωγή τόσο ουρικού οξέος, ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μορίου όσο και ελευθέρων ριζών). Έτσι, δεν είναι ακόμα σαφές αν έχει αντιοξειδωτικό ρόλο (Gomez-Cabrera et al., 2005) ή αν όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής προκαλεί οξειδωτικό στρες. Δεν υπάρχει όμως συνέπεια στην επίδραση των δύο παρεμβάσεων που εφαρμόστηκαν (άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης) στη συγκέντρωση της αλβουμίνης. Μια ανάλογη διαφορά σε παρόμοιες παρεμβάσεις έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη εργασία όπου η συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορό αυξήθηκε μετά την άσκηση αλλά έμεινε ανεπηρέαστη μετά από τη χορήγηση εξωγενών αντιοξειδωτικών (Lamprecht et al., 2008). Μία ακόμα πιθανή εξήγηση για την ασυμφωνία αυτή είναι ότι η αύξηση των επιπέδων της αλβουμίνης εξαρτάται από το είδος του ερεθίσματος, που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Κάτι τέτοιο έχει αναφερθεί και από προηγούμενη εργασία, στην οποία η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε σε περίπτωση διαβήτη (όπου προκαλείται συστηματικό οξειδωτικό στρες) και όχι σε περιπτώσεις καταρράκτη ή μυϊκών παθήσεων σχετικών με την ηλικία (όπου προκαλείται τοπικό οξειδωτικό στρες) (Oetl et al., 2010).

Η εργασία αυτή είναι η πρώτη που εκτίμησε τις επιδράσεις δύο διαφορετικών παρεμβάσεων στη συγκέντρωση της αλβουμίνης σε ιστούς θηλαστικών. Επίσης, έδειξε ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μονομερούς και διμερούς αλβουμίνης ως πιθανού αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Ωστόσο, το γεγονός ότι η αλοπουρινόλη, ένα μόριο που προκαλεί οξειδωτικό στρες, δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της αλβουμίνης δείχνει ότι πιθανόν η αλλαγή στη συγκέντρωσή της

εξαρτάται από το ερέθισμα. Η παρατήρηση αυτή ίσως είναι ένας περιορισμός για τη χρησιμοποίηση της αλβουμίνης ως δείκτη οξειδωτικού στρες. Ο μηχανισμός μεταφοράς της αλβουμίνης στους ιστούς, η πιθανότητα η αύξηση των επιπέδων της να εξαρτάται από το ερέθισμα που εφαρμόζεται κάθε φορά και ο ακριβής της ρόλος στην αντιοξειδωτική άμυνα, λοιπόν, χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

Στα πλαίσια εκτίμησης των επιδράσεων της άσκησης στην πρωτεϊνική έκφραση των σκελετικών μυών, εφαρμόστηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων στον υποκνημίδιο μυ και τον EDL. Φάνηκε ότι η διακύμανση του πρωτεϊνικού προφίλ ανάμεσα στα ζώα ήταν πολύ μεγάλη. Έτσι, ήταν δύσκολο να βρεθούν πρωτεΐνες, οι οποίες είχαν το ίδιο μοτίβο έκφρασης στα ζώα με επαναλήψιμο τρόπο. Αυτό έγινε μόνο για δύο πρωτεΐνες. Η πρώτη ήταν η κρεατινική κινάση, που εμφανίστηκε στα πηκτώματα των ζώων στην ομάδα ελέγχου ενώ δεν υπήρχε αμέσως μετά την άσκηση. Η δεύτερη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε ήταν η *four and a half LIM domains 1*, που υπήρχε μόνο στα πηκτώματα των ζώων μετά την άσκηση. Η FHL1, γνωστή και ως πρωτεΐνη LIM-1 του σκελετικού μυός (SLIM1), εκφράζεται κυρίως στο σκελετικό μυ. Οι πρωτεΐνες FHL αποτελούν καινούρια μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας LIM. Η FHL1 συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη του σκελετικού μυός και λειτουργεί ως βοηθητικός παράγοντας για τη συναρμολόγηση των πρωτεϊνών στον πλούσιο σε ακτίνη κυτταροσκελετό (Loughna et al., 2000). Έχει προταθεί ότι μία από τις επικράτειες της FHL1 LIM αλληλεπιδρά με την α-ακτίνη ενώ αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών LIM με ινίδια ακτίνης και σπεκτρίνης έχουν δείξει και για την επικράτεια FHL3 (Coghill et al., 2003). Τέλος, έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι η FHL1 συμμετέχει στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης του σκελετικού μυός (McGrath et al., 2003).

Από τα παραπάνω δεδομένα καθίσταται σαφές ότι η αλοπουρινόλη, ως συνθετικός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης, έχει δυσμενείς επιδράσεις τόσο στην απόδοση όσο και στην οξείδωση των μακρομορίων. Παρά το γεγονός ότι στο παρελθόν έχει αναφερθεί ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, φαίνεται αυτό να μην επιβεβαιώνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα. Επίσης, με την αναστολή της δραστηριότητάς της τελικά η αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών φαίνεται να μειώνεται λόγω της αναστολής της παραγωγής του ουρικού οξέος.

Ακολούθως, μελετήθηκε η *in vitro* δράση εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστηριότητα της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης, σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων και στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, ενός

ενζύμου με διπλό ρόλο (Ji, 1999). Οι επιδράσεις αυτές μπορεί να αποκαλύψουν ιδιότητες των φυτοχημικών αντιοξειδωτικών καθώς τα ένζυμα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο σε καταστάσεις που προκαλούν οξειδωτικό στρες όπως είναι η άσκηση.

Τα φρούτα, τα λαχανικά και το κρασί είναι βασικά συστατικά της Μεσογειακής διατροφής. Τα εκχυλίσματα σταφυλιών και το κρασί έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών επιδράσεών τους στην υγεία. Προηγούμενες εργασίες έχουν αναφέρει ότι η κατανάλωση σταφυλιών σχετίζεται με την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Renaud & de Lorgeril, 1992), της καρκινογένεσης (Singh et al., 2004), ενώ έχει και αντιμικροβιακή δράση (Jayaprakasha et al., 2003). Το είδος σταφυλιών *Vitis vinifera* καλλιεργείται στην Ελλάδα και βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα από τα σταφύλια του είδους αυτού έχουν αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Stagos et al., 2004, 2005, 2007). Οι βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών αποδίδονται εν μέρει στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες διάφορων συστατικών τους, όπως τα φαινολικά οξέα, οι φλαβονόλες, οι φλαβονόλες, οι ανθοκυανίνες και τα στιλβένια (Renaud & de Lorgeril, 1992; Revilla & Ryan, 2000; Soleas et al., 1997). Τα αντιοξειδωτικά της διατροφής συνεισφέρουν στην πρόληψη της οξειδωτικής καταστροφής των μακρομορίων (Ji, 1999). Για το λόγο αυτό, τα αντιοξειδωτικά και οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μέρος της διατροφής ή ως συμπληρώματα. Αντίθετα, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν την προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, ειδικότερα σε συστήματα με μέταλλα (Cotelle, 2001; Halliwell, 2007). Έχουν εξεταστεί στο παρελθόν διάφορα εκχυλίσματα από το είδος σταφυλιών *Vitis vinifera* για τις αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα της ποικιλίας αυτής και οι πολυφαινόλες που περιέχονται σε αυτά έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες και προστατεύουν το DNA από τη δράση των ελευθέρων ριζών (Stagos et al., 2005). Επιπλέον, έδειξαν αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες ενάντια στην προκαλούμενη από μπεομυκίνη μεταλλαξιγένεση στην *Salmonella typhimurium* TA102 (Stagos et al., 2004) και τις προκαλούμενες από τη μιτομυκίνη c χρωματιδιακές ανταλλαγές σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Stagos et al., 2007).

Η πλειονότητα των εκχυλισμάτων ανέστειλε τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και τα πιο δραστικά ήταν τα εκχυλίσματα των βόστρυχων, ενώ τα εκχυλίσματα των καρπών είχαν τη μικρότερη ανασταλτική δράση. Όλα τα

εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δραστικότητα της καταλάσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και τα εκχυλίσματα των βόστρυχων είχαν την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση. Τα περισσότερα από τα εκχυλίσματα είχαν ενεργοποιητική δράση στην υπεροξειδική δισμουτάση σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα άλλα δύο ένζυμα. Οι περισσότερες εργασίες εξετάζουν κυρίως εκχυλίσματα από καρπούς σταφυλιών για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Shi et al., 2003). Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν εκχυλίσματα από βόστρυχους, στέμφυλα και καρπούς, τα οποία είναι πλούσια σε ισχυρές βιοδραστικές ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες (Anastasiadi et al., 2009). Επίσης, τα στέμφυλα είναι παραπροϊόντα της οινοποίησης αλλά φαίνεται ότι έχουν βιολογική δράση και η εκμετάλλευσή τους μπορεί να είναι ωφέλιμη και για το περιβάλλον. Η πλειονότητα των εκχυλισμάτων, που μελετήθηκαν επηρέασε τη δραστικότητα και των τριών ενζύμων. Συγκεκριμένα, ανέστειλαν τη δραστικότητα της καταλάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης, ενώ έδρασαν ενεργοποιητικά στην υπεροξειδική δισμουτάση, αλλά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις που δεν έχουν βιολογική αξία διότι δεν μπορούν να επιτευχθούν *in vivo*. Η ανασταλτική δράση στην καταλάση και την οξειδάση της ξανθίνης διαφέρει ανάμεσα στα εκχυλίσματα των διαφορετικών τμημάτων των φυτών. Τα εκχυλίσματα των βόστρυχων και των στέμφυλων επηρέασαν τη δραστικότητα της καταλάσης σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με την οξειδάση της ξανθίνης. Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων καρπών ήταν διαφορετική σε σχέση με τα εκχυλίσματα από τα άλλα τμήματα των φυτών καθώς ανέστειλαν τη δραστικότητα της καταλάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης σε παρόμοιες συγκεντρώσεις.

Σύμφωνα με το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, τα εκχυλίσματα των καρπών δεν είναι τόσο πλούσια σε κατεχίνες ((+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, επιγαλοκατεχόνη) όσο τα εκχυλίσματα βόστρυχων και στέμφυλων. Επιπρόσθετα, πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και τα φαινολικά οξέα δεν υπάρχουν σε σημαντικές συγκεντρώσεις στα εκχυλίσματα καρπών. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα βόστρυχων και στέμφυλων έχουν μεγαλύτερη ποικιλία πολυφαινολών (π.χ. περιέχουν *trans*-ρεσβερατρόλη) σε σχέση με τα εκχυλίσματα καρπών. Συμπερασματικά, η διαφορά στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική πολυφαινολική τους σύσταση. Πιθανές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων είναι, επίσης, υπεύθυνες για τη διαφορετική επίδρασή τους στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και της καταλάσης.

Η αναστολή της δραστηριότητας της καταλάσης από τα εκχυλίσματα υπαινίσσεται οξειδωτική δράση καθώς το ένζυμο αυτό συμβάλλει στην εξουδετέρωση του  $H_2O_2$  (Halliwell, 2005). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, που εμφάνισαν ενεργοποίηση στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης είναι πολύ υψηλές για να επιτευχθούν στους ανθρώπινους ιστούς και ήταν 100 φορές πιο υψηλές σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που έδειξαν αναστολή στη δραστηριότητα της καταλάσης. Το αποτέλεσμα αυτό υπονοεί ότι η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων είναι καίριας σημασίας για τις αντιοξειδωτικές ή οξειδωτικές ιδιότητές τους. Το φαινόμενο αυτό συμφωνεί με το λεγόμενο αντιοξειδωτικό παράδοξο (Halliwell, 2000).

Η εργασία αυτή αναγνώρισε ορισμένα εκχυλίσματα ως ισχυρούς αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης. Η δράση τους αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στο πολυφαινόλικό τους περιεχόμενο καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι πολυφαινόλες όπως οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης (Cotelle, 2001; Cos et al., 1998). Η οξειδάση της ξανθίνης είναι το κυριότερο ένζυμο παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Ωστόσο, συμβάλλει και στην παραγωγή ουρικού οξέος, ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μορίου (Gomez-Cabrera et al., 2005), ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών. Στη διατριβή αυτή βρέθηκε ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης μείωσε την απόδοση μετά από εξαντλητική κολύμβηση σε επίμυες και οδήγησε σε οξειδωτικό στρες πιθανώς εξαιτίας της αναστολής της παραγωγής του ουρικού οξέος. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις αυτές μπορούν να επιτευχθούν μετά από χορήγηση των εκχυλισμάτων. Έτσι, η χορήγηση αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης πριν από ερεθίσματα που προκαλούν οξειδωτικό στρες όπως η άσκηση χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Τα αποτελέσματα από την *in vitro* μελέτη των εκχυλισμάτων έδειξαν ότι παρά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες έδειξαν οξειδωτική δράση στα ένζυμα, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες. Έτσι, ο όρος «αντιοξειδωτικό» δεν είναι κάτι απόλυτο αλλά εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το σύστημα που μελετάται. Ένα από τα εκχυλίσματα με τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro* (Stagos et al., 2005, 2007) αλλά και με ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης, αυτό από τον καρπό του σταφυλιού της ποικιλίας μπατίκι Τυρνάβου χορηγήθηκε σε επίμυες πριν από την άσκηση. Σκοπός ήταν να ελεγχθεί αν οι *in vitro* αντιοξειδωτικές του ιδιότητες θα επιβεβαιωθούν *in vivo* και αν η *in vitro* ανασταλτική

του δράση απέναντι στην οξειδάσης της ξανθίνης θα έχει επίδραση στην απόδοση, όπως η αλοπουρινόλη.

Η άσκηση προκάλεσε οξειδωτικό στρες στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα. Αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS παρατηρήθηκε στο γαστροκνήμιο μυ και τον καρδιακό μυ, στον οποίο αυξήθηκε και η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τέλος, μειώθηκε η συγκέντρωση της GSH στο ήπαρ ενώ αυξήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ. Η χορήγηση του εκχυλίσματος προκάλεσε, επίσης, οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από τη μείωση της συγκέντρωσης της GSH στα ερυθροκύτταρα μετά την άσκηση, από την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα και των TBARS στα ερυθροκύτταρα. Το εκχύλισμα προκάλεσε οξειδωτικό στρες και στην ηρεμία καθώς βρέθηκε αυξημένη η συγκέντρωση των TBARS. Οξειδωτικό στρες παρατηρήθηκε και στους υπόλοιπους ιστούς όπως φάνηκε από την αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ, την αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS μετά την άσκηση και στην ηρεμία καθώς και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ηρεμία στον καρδιακό μυ. Στο ήπαρ αυξήθηκε η συγκέντρωση των TBARS μετά την άσκηση ενώ στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ αυξήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και μειώθηκε η συγκέντρωση της GSH. Επιπλέον, μετά τη μελέτη των επιδράσεων του εκχυλίσματος και της άσκησης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα και τους ιστούς βρέθηκε πτώση της συγκέντρωσής της μετά την άσκηση και την ταυτόχρονη χορήγηση εκχυλίσματος και αύξηση της συγκέντρωσής της στο γαστροκνήμιο μυ στις ίδιες συνθήκες. Αυτό το αποτέλεσμα καταδεικνύει την πιθανή είσοδο της αλβουμίνης από το πλάσμα στο μυ για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης βρέθηκε αυξημένη τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση στον καρδιακό μυ στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα με τον ίδιο λόγο ως πιθανή αιτία. Η απουσία επιδράσεων των δύο παρεμβάσεων όμως στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στους άλλους ιστούς δείχνει ότι δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα καθώς το θέμα αυτό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στο παρελθόν έχουν αναφερθεί εργασίες στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι η χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων πριν την άσκηση έχει αντιοξειδωτική δράση.

Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες, στις οποίες προκλήθηκε οξειδωτικό στρες μετά τη χορήγηση εκχυλίσμάτων. Είναι, λοιπόν, δυνατό εκχυλίσματα με αντιοξειδωτική δράση όταν χορηγούνται *in vivo* να έχουν οξειδωτικό αποτέλεσμα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πείραμα χορήγησης αλοπουρινόλης και σε εκείνο, που χορηγήθηκε το φυτικό εκχύλισμα βρέθηκε ότι οι επιδράσεις της αλοπουρινόλης ήταν πιο δριμύεις σε σχέση με το εκχύλισμα. Ακόμα, υπήρξε και σημαντική διαφορά στο βαθμό οξείδωσης των μακρομορίων. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης προκάλεσε περίπου 4πλάσια αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και 3πλάσια αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS στα ερυθροκύτταρα στην ηρεμία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αντίστοιχη αύξηση που προκάλεσε το εκχύλισμα ήταν περίπου διπλάσια για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ενώ κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τα TBARS. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αλοπουρινόλης χορηγήθηκε σε 6πλάσια συγκέντρωση (50 mg/kg σωματικού βάρους) σε σχέση με το εκχύλισμα (300 mg/kg σωματικού βάρους).

Όσον αφορά στην απόδοση, δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση του εκχυλίσματος καθώς ο χρόνος μέχρι να επέρθει η εξάντληση ήταν ο ίδιος και για τις δύο ομάδες επιμύων. Έχουν αναφερθεί εργασίες στη βιβλιογραφία, οι οποίες μέτρησαν την απόδοση και μετά από χορήγηση αντιοξειδωτικών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Σε κάποιες από αυτές, που έγιναν στον άνθρωπο δε βρέθηκε καμία επίδραση των αντιοξειδωτικών και πιο συγκεκριμένα της βιταμίνης E στην απόδοση (Lawrence et al., 1975; Sumida et al., 1989; Snider et al., 1992; Rokitzki et al., 1994; Powers & Hamilton, 1999). Η απόδοση δεν επηρεάστηκε σε μία ακόμα εργασία σε επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε σελήνιο (συμπαράγοντας για την GPX) πριν από εξαντλητικό τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο (Lang et al., 1987). Υπάρχουν, όμως, εργασίες, οι οποίες αναφέρουν αύξηση της απόδοσης *in vivo* μετά από χορήγηση NAC (N-ακετυλο κυστεΐνης) στον άνθρωπο (Reid et al., 1994) και βιταμίνης E σε ποντίκια που έκαναν κολύμβηση (Novelli et al., 1990). Αναφέρονται, τέλος, στη βιβλιογραφία και εργασίες που παρατήρησαν βελτίωση της απόδοσης *in situ* στο διάφραγμα μετά από χορήγηση NAC (Shindoh et al., 1990; Vina et al., 2000).

Η χορήγηση αλοπουρινόλης προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης στους ιστούς που εξετάστηκαν περίπου στο 1/4. Κάτι τέτοιο όμως δεν επαναλήφθηκε μετά τη χορήγηση εκχυλίσματος καθώς η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης ήταν μειωμένη τόσο πριν όσο και μετά από την άσκηση σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός σε ποσοστό έως 50%

στο αίμα. Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης ήταν επίσης μειωμένη στην ηρεμία και στο γαστροκνήμιο μυ αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό ενώ στους υπόλοιπους ιστούς δεν επηρεάστηκε από το εκχύλισμα. Η αρχική υπόθεση, η οποία συσχέτιζε την πτώση της απόδοσης μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης με την αναστολή της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης φάνηκε να επιβεβαιώνεται και σε αυτό το πείραμα. Το ουρικό οξύ είναι πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της απόδοσης και καθώς δεν επηρεάστηκε ουσιαστικά από το εκχύλισμα, δεν επηρεάστηκε και η απόδοση των επιμύων.



### **Συμπεράσματα – προοπτικές**

Η διατριβή αυτή είχε ως στόχο την απάντηση ορισμένων βασικών ερωτημάτων σχετικών με την έρευνα στον τομέα της βιολογίας και βιοχημείας της άσκησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο, του οποίου η δράση είναι θεμελιώδους σημασίας κατά την άσκηση. Η αναστολή του πριν την άσκηση σε επίμυες προκάλεσε σημαντική πτώση της απόδοσης, γεγονός που καταδεικνύει την πολύ σημαντική δράση του ουρικού οξέος, καθώς όταν η παραγωγή του ανασταλεί ο οργανισμός δεν μπορεί να ανταπεξέρθει στην απώλεια της αντιοξειδωτικής του ικανότητας. Εκτός από την πτώση της απόδοσης, η χορήγηση της αλοπουρινόλης προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων του αίματος και των σκελετικών μυών. Οι διάφοροι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν το μέσο για την αξιολόγηση αυτών των επιδράσεων. Μετά από ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από τους δείκτες βρέθηκε ότι ο συνδυασμός μερικών από αυτούς όταν μετρηθούν στο αίμα αντανakλούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών. Όσον αφορά στο σκελετικό μυ, που είναι ο κύριος ιστός μελέτης κατά την άσκηση η GSH, GSSG και η καταλάση των ερυθροκυττάρων και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια του πλάσματος δίνουν πληροφορίες για το οξειδωτικό στρες στο μυ. Επιπλέον, φάνηκε ότι η μονομερής και διμερής αλβουμίνη πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω καθώς οι μεταβολές της συγκέντρωσής τους σε κατάσταση οξειδωτικού στρες τείνουν να της δώσουν την ισχύ ενός νέου δείκτη εκτίμησης του οξειδωτικού στρες. Τέλος, έγινε κατανοητό ότι αν ένα εκχύλισμα έχει αντιοξειδωτική δράση *in vitro* δε σημαίνει ότι αυτό ισχύει και σε ένα *in vivo* σύστημα καθώς η δράση ενός αντιοξειδωτικού εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του και το σύστημα, στο οποίο μελετάται.

Στο μέλλον αξίζει να μελετηθεί ο ρόλος των πολλών δεικτών εκτίμησης του οξειδωτικού στρες και να γίνει αντιληπτό τι εκφράζει ο καθένας. Ένα ακόμα ενδιαφέρον κομμάτι της έρευνας θα μπορούσε να στραφεί στη μελέτη συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών, όπως είναι η γλουταθειόνη ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στον οργανισμό κατά τη χορήγησή τους πριν την άσκηση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Aebi H** (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121–126.
- Aguilo A**, Tauler P, Fuentespina E (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84(1), 1-7.
- Ajmani RS**, Fleg JL, Demehin AA, Wright JG, O'Connor F, Heim JM, Tarien E, Rifkind JM (2003). Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 28, 29-40.
- Alessio HM** (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25(2), 218-24.
- Alessio HM**, Goldfarb AH, Cao G (1997). Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr* 7(1), 1–9.
- Alessio HM**, Hagerman AE (2006). Oxidative stress, exercise and aging. London, Imperial College Press.
- Alessio HM**, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32, 1576-1581.
- Alessio HM**, Hagerman AE, Nagy S, Philip B, Byrnes RN, Woodward JL, Callahan P, Wiley RL (2005). Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. *Physiol Behav* 84, 65-72).
- Ali M**, Manolios N (2005). Proteomics in rheumatology: a new direction for old diseases. *Semin Arthritis Rheum* 35, 67-76.
- Anastasiadi M**, Chorianopoulos NG, Nychas GJ, Haroutounian SA (2009). Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J Agric Food Chem* 57, 457-463.
- Antunes F**, Derick H, Cadenas E (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 33(9), 1260-7.
- Araujo JA**, Falavigna G, Rogero MM, Pires ISO, Pedrosa RG, Castro IA, Donato JJ, Tirapequi J (2006). Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. *Life Sciences* 79, 1343–1348
- Argüelles S**, García S, Maldonado M, Machado A, Ayala A (2004). Do the serum oxidative stress markers provide a reasonable index of the general oxidative stress status?. *Biochim Biophys Acta* 1674, 251-259.
- Ashton T**, Rowlands CC, Jones E, Young IS, Jackson SK, Davies B, Peters JR (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 77(6): 498-502.

- Badway JA**, Robinson JM, Karnovsky MJ, Karnovsky ML (1981). Superoxide production by an unusual aldehyde oxidase in guinea pig granulocytes. *J Biol Chem* 256, 3479-3486.
- Barclay J**, Hansel M (1991). Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol* 69, 279–284.
- Bateman RM**, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis CG (2001). Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2848–H2856.
- Bejma J**, Ji LL (1999). Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 87(1), 465–470.
- Berlett BS**, Stadtman ER (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313–20316.
- Bermejo P**, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM (2008). Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res* 42, 162-170.
- Betticher DC**, Reinhart WH, Geiser J (1995). Effect of RBC shape and deformability on pulmonary O<sub>2</sub> diffusing capacity and resistance to flow in rabbit lungs. *J Appl Physiol* 78, 778–783.
- Betz AL** (1985). Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* 44, 574-579.
- Bieber JD**, Terkeltaub RA (2004). Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum* 50, 2400–2414.
- Bloomer RJ**, Davis PG, Consitt LA, Wideman L (2007a). Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *Int J Sports Med* 28(1), 21–25.
- Bloomer RJ**, Fry AC, Falvo MJ, Moore CA (2007b). Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport* 10(6), 411–417.
- Bloomer RJ**, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 19(2), 276–285.
- Boluyt MO**, Brevick JL, Rogers DS, Randall MJ, Scalia AF, Li ZB (2006). Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics* 6, 3154–3169.

- Boparai RK**, Kiran R, Bansal DD (2007). Insinuation of exacerbated oxidative stress in sucrose-fed rats with a low dietary intake of magnesium: evidence of oxidative damage to proteins. *Free Radic Res* 41, 981-989.
- Boros M**, Bako L, Nagy S (1991). Effect of antioxidant therapy on cyclooxygenase-derived eicosanoid release during intestinal ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res* 23, 141-150.
- Botsoglou NA**, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG (1994). Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *J Agric Food Chem* 42, 1931-1937.
- Bourdon E**, Blache D (2001). The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 3, 293-311.
- Bourdon E**, Loreau N, Blache D (1999). Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 13, 233-244.
- Bourdon E**, Loreau N, Lagrost L, Blache D (2005). Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res* 39, 15-20.
- Bradford MM** (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brady PS**, Brady LJ, Ullrey DE (1979). Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J Nutr* 109(6), 1103-1109.
- Brantley RE**, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 268(10), 6995-7010.
- Bray RC** (1975). Molybdenum iron/sulphur flavin hydroxylases and related enzymes. In the Enzymes, ed. Boyer, P. D., Vol. 12 part B, 3rd edition, Academic Press, London, p.300.
- Brooks GA**, Mercier J (1994). Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the “crossover” concept. *J App Physiol* 76(6), 2253-2261.
- Brozinick JT**, Etgen GJ, Yaspelkis BB, Ivy JL (1994). The effects of muscle contraction and insulin on glucose-transporter translocation in rat skeletal muscle. *Biochem J* 297, 539-545.
- Buehler PW**, Alayash AI (2005). Redox biology of blood revisited: the role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity. *Antioxid Redox Signal* 7, 1755-1760.
- Burniston JG** (2008). Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. *Biochim Bioph Acta* 1784, 1077-1086.

- Burniston JG**, McLean L, Beynon RJ, Goldspink DF (2007). Anabolic effects of a nonmyotoxic dose of the 2-adrenergic receptor agonist clenbuterol on the rat plantaris muscle. *Muscle Nerve* 35, 217–223.
- Cai D**, Li M, Lee K, Wong W, Chan K (2000). Age-related changes of aqueous protein profiles in rat fast and slow twitch skeletal muscles. *Electrophoresis* 21, 465–472.
- Capitanio D**, Vigano A, Ricci E, Cerretelli P, Wait R, Gelfi C (2005). Comparison of protein expression in human deltoideus and vastus lateralis muscles using two dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5, 2577–2586.
- Carballal S**, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R (2006). Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* 32, 543–51.
- Chevion S**, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(9), 5119–5123.
- Child RB**, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 30(11), 1603–7.
- Childs A**, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med* 31, 745–753.
- Chung YW**, Oh HY, Kim JY, Kim JH, Kim IY (2004). Allergen-induced proteolytic cleavage of annexin-1 and activation of cytosolic phospholipase A2 in the lungs of a mouse model of asthma. *Proteomics* 4, 3328–34.
- Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC (2004). Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteom* 3, 577–585.
- Cimen MY** (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 390, 1–11.
- Cocco T**, Sgobbo P, Clemente M, Lopriore B, Grattagliano I, Di Paola M, Villani G (2005). Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats: effect of a long-term dietary treatment with N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 38, 796–805.
- Coghill ID**, Brown S, Cottle DL, McGrath MJ, Robinson PA, Nandurkar HH, Dyson JM, Mitchell CA (2003). FHL3 is an actin-binding protein that regulates alpha-actinin-mediated actin bundling: FHL3 localizes to actin stress fibers and enhances cell spreading and stress fiber disassembly. *J Biol Chem* 278, 24139–24152.
- Cooper CE**, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 30(2), 280–5.

- Cos P**, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61, 71-76.
- Cotelle N** (2001). Role of Flavonoids in Oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1, 569-590.
- Coyle EF**, Montain SJ (1992). Carbohydrate and fluid ingestion during exercise: Are there tradeoffs? *Med Sci Sport Exerc* 24, 671.
- Cutler RG** (1984). Aging and Cell Function, ed. Johnson, J.E. Jr. (Plenum Press, New York), 1-148.
- Das KC**, Lewis-Molock Y, White CW (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 713-26.
- Davies KJA**, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1198–1205.
- Davison G**, Gleeson M, Phillips S (2007). Antioxidant supplementation and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *Med Sci Sports Exerc* 39(4), 645–652.
- Dawson CA**, Nadel ER, Horvath SM (1968). Cardiac output in the cold-stressed swimming rat. *Am J Physiol* 214, 320-325.
- Delaunay J**, Alloisio N, Morle L, Pothier B (1990). The red cell skeleton and its genetic disorders. *Mol Aspects Med* 11, 161–241.
- Devries MC**, Hamadeh MJ, Glover AW, Raha S, Samjoo IA, Tarnopolsky MA (2008). Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women. *Free Radic Biol Med* 45(4), 503-11.
- Di Meo S**, Venditti P (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10, 125-40.
- Di Simplicio P**, Rossi R, Falcinelli S, Ceserani R, Formento ML (1997). Antioxidant status in various tissues of the mouse after fasting and swimming stress. *Eur J Appl Physiol* 76, 302-7).
- Dieterich S**, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101, 33-39.
- Doehner W**, Schoene N, Rauchhaus M, Leyva-Leon F, Pavitt DV, Reaveley DA, Schuler G, Coats AJ, Anker SD, Hambrecht R (2002). Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebocontrolled studies. *Circulation* 105, 2619–2624.

- Doherty MK**, McLean L, Hayter JR, Pratt JM, Robertson DH, El-Shafei A, Gaskell SJ, Beynon RJ (2004). The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics* 4, 2082–2093.
- Donoghue P**, Doran P, Dowling P, Ohlendieck K (2005). Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. *Biochim Biophys Acta* 1752, 166–176.
- Donoghue P**, Doran P, Wynne K, Pedersen K, Dunn MJ, Ohlendieck K (2007). Proteomic profiling of chronic low-frequency stimulated fast muscle. *Proteomics* 7, 3417–3430.
- Doran P**, Gannon J, O'Connell K, Ohlendieck K (2007). Aging skeletal muscle shows a drastic increase in the small heat shock proteins alphaB-crystallin/HspB5 and cvHsp/HspB7. *Eur J Cell Biol* 86, 629–640.
- Doran P**, O'Connell K, Gannon J, Kavanagh M, Ohlendieck K (2008). Opposite pathobiochemical fate of pyruvate kinase and adenylate kinase in aged rat skeletal muscle as revealed by proteomic DIGE analysis. *Proteomics* 8, 364–377.
- Doumas BT**, Watson WA, Biggs HG (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31, 87-96.
- Drmanovic Z**, Voyatzi S, Kouretas D, Sahpazidou D, Papageorgiou A, Antonoglou O (1999). Albumin possesses intrinsic enolase activity towards dihydrotestosterone which can differentiate benign from malignant breast tumors. *Anticancer Res* 19, 4113-24.
- Duarte JA**, Appell HJ, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM (1993). Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* 14(8), 440-3.
- Duthie GG**, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 282(1), 78–83.
- Elion GB** (1988). The purine path to chemotherapy. Nobel lecture. Burroughs Wellcome Co., Research Triangle Park, NC.
- Ellmerer M**, Schaupp L, Brunner G, Sendlhofer G, Wutte A, Wach P, Pieber P (2000). Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, 352-356.
- Elokda AS**, Shields RK, Nielsen DH (2005). Effects of a maximal graded exercise test on glutathione as a marker of acute oxidative stress. *J Cardiopulm Rehabil* 25(4), 215–219.
- Elosua R**, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordóñez-Llanos J, Marrugat J (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 167, 327–334.

- Enroth C**, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF (2000). Crystal structure of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10723–10728.
- Evans WJ** (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 72(S), 647-52.
- Fabian E**, Elmadfa I (2007). The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti-oxidant parameters in plasma of young healthy women. *Int J Vitam Nutr Res* 77, 79-88.
- Faff J**, Frankiewicz-Jozko A (1997). Effect of ubiquinone on exercise-induced lipid peroxidation in rat tissues. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75(5), 413–417.
- Fell RD**, McLane JA, Winder WW, Holloszy JO (1980). Preferential resynthesis of muscle glycogen in fasting rats after exhausting exercise. *Am J Physiol* 238, 328-332.
- Felsted RL**, Chu AEY, Chaykin S (1973). Purification and properties of the aldehyde oxidase from hog and rabbit livers. *J Biol Chem* 248, 2580-2587.
- Ferguson LR** (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mut Res* 475, 89-111.
- Ferguson LR**, Whiteside G, Holdaway KM, Baguley BC (1996). Application of fluorescence in situ hybridisation to studying the relationship between cytotoxicity, chromosomal aberrations and changes in chromosome number after treatment with the topoisomerase II inhibitor, amsacrine. *Environ Mol Mutagen* 27, 255–262.
- Ferrando A**, Vila L, Voces JA, Cabral AC, Alvarez AI, Prieto JG (1999). Effects of a standardized Panax ginseng extract on the skeletal muscle of the rat: a comparative study in animals at rest and under exercise. *Planta Med* 65(3), 239-44.
- Finaud J**, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4), 327-358.
- Fisher-Wellman K**, Bloomer RJ (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 8:1.
- Fuchs J**, Weber S, Podda M, Groth N, Herrling T, Packer L, Kaufmann R (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 34(3), 330-6.
- Gao R**, Yuan Z, Zhao Z, Gao X (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerg* 45, 41–5.
- Gavin AD**, Struthers AD (2005). Allopurinol reduces B-type natriuretic peptide concentrations and haemoglobin but does not alter exercise capacity in chronic heart failure. *Heart* 91,749–753.
- Gelfi C**, De Palma S, Cerretelli P, Begum S, Wait R (2003). Two-dimensional protein map of human vastus lateralis muscle. *Electrophoresis* 24, 286–295.



- Gelfi C**, Vigano A, De Palma S, Ripamonti M, Begum S, Cerretelli P, Wait R (2006a). 2-D protein maps of rat gastrocnemius and soleus muscles: a tool for muscle plasticity assessment. *Proteomics* 6, 321–340.
- Gelfi C**, Vigano A, Ripamonti M, Pontoglio A, Begum S, Pellegrino MA, Grassi B, Bottinelli R, Wait R, Cerretelli P (2006b). The human muscle proteome in aging, *J Proteome Res* 5, 1344–1353.
- Ghio AJ**, Kennedy TP, Stonehuerner J, Carter JD, Skinner KA, Parks DA, Hoidal JR (2002). Iron regulates xanthine oxidase activity in the lung. *Am J Physiol* 283, L563–L572.
- Giakoustidis D**, Kontos N, Iliadis S, Papageorgiou G, Tsantilas D, Spyridis C, Papazoglou K, Botsoglou N, Dimitriadou A, Giakoustidis E (2001). Severe total hepatic ischemia and reperfusion: Relationship between very high  $\alpha$ -Tocopherol uptake and lipid peroxidation. *Free Radic Res* 35, 103–109.
- Giulivi C**, Cadenas E (1998). Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 24(2), 269–79.
- Godber BL**, Schwarz G, Mendel RR, Lowe DJ, Bray RC, Eisenthal R, Harrison R (2005). Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. *Biochem J* 388, 501–508.
- Gohil K**, Viguie C, Stanley WC, Brooks GA, Packer L (1988). Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 64(1), 115–119.
- Goldfarb AH** (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 24(3), 249–66.
- Goldfarb AH**, Bloomer R, McKenzie MJ (2004). Effect of microhydrin on blood lactate, protein carbonyls, and glutathione status in rats before and after aerobic exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14(5), 550–559.
- Goldfarb AH**, Patrick SW, Bryer S, You T (2005). Vitamin C supplementation affects oxidative stress blood markers in response to a 30-minute run at 75%  $\text{VO}_{2\text{max}}$ . *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 15(3), 279–290.
- Goldwasser P**, Feldman J (1997). Association of serum albumin and mortality risk. *J Clin Epidemiol* 50, 693–703.
- Gomez-Cabrera MC**, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567, 113–120.
- Gomez-Cabrera MC**, Close GL, Kayani A, McArdle A, Viña J, Jackson MJ (2010). Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle force generation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(1), R2–8.

- Gomez-Cabrera MC**, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J, Vina J (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1, S31-33.
- Gomez-Cabrera MC**, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289, 2503-2504.
- Goto C**, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I (2003). Effect of different intensities of exercise on endothelium dependent vasodilation in humans: Role of endothelium dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* 108(5), 530–535.
- Granger DN**, Hollwarth ME, Parks DA (1986). Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 548(Suppl.), 47–63.
- Graves PR**, Haystead TA (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 39–63.
- Groussard C**, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 89, 169–175.
- Guelfi KJ**, Casey TM, Giles JJ, Fournier PA, Arthur PG (2006). A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 952–957.
- Gutteridge JM** (1986). Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta* 869, 119–127.
- Hall DM**, Buettner GR, Matthes RD, Gisolfi CV (1994). Hyperthermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of .NO-heme in blood. *J Appl Physiol* 77, 548–553.
- Halliwell B** (1988). Albumin – an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 37, 569–571.
- Halliwell B** (2000). The antioxidant paradox. *Lancet* 355, 1179-1180.
- Halliwell B** (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
- Halliwell B** (2005). Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
- Halliwell B** (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* 73, 341-347.

- Halliwell B**, Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 57 (suppl 1), 715S-725S.
- Halliwell B**, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
- Hansford RG**, Hogue BA, Mildaziene V (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr* 29, 89-95.
- Harrison R** (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 33(6), 774–797.
- Hebbel RP**, Eaton JW (1989). Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane. *Semin Hematol* 26, 136-149.
- Hellsten Y**, Ahlborg G, Jensen-Urstad M, Sjodin B (1988). Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand* 134, 159-160.
- Hellsten-Westing Y**, Ekblom B, Sjodin B (1989). The metabolic relation between hypoxanthine and uric acid in man following maximal short-distance running. *Acta Physiol Scand* 137, 341-345.
- Hertog MG**, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D (1996). Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 5, 673–677.
- Hertog MGL**, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn C, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S (1995). Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Int Med* 155, 381–386.
- Hertog MGL**, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D (1997). Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am J Clin Nutr* 65, 1489–1494 in Escherichia coli B, *Mutat Res* 243, 273–280.
- Heunks LM**, Vina J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN (1999). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* 277, R1697-1704.
- Hittel DS**, Hathout Y, Hoffman EP (2007). Proteomics and systems biology in exercise and sport sciences research. *Exerc Sport Sci Rev* 35, 5–11.
- Hittel DS**, Hathout Y, Hoffman EP, Houmard JA (2005). Proteome analysis of skeletal muscle from obese and morbidly obese women. *Diabetes* 54, 1283–1288.
- Hojlund K**, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey SJ, Roepstorff P, Handberg A, Dela F, Vinten J, McCormack JG, Reynet C, Beck-Nielsen H (2003). Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta-subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem* 278, 10436–10442.

- Hooper DC**, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H (1998). Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 675–680.
- Horowitz J**, Klein S (2000). Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr* 72(2), 558S–563S.
- Horowitz JF** (2003). Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab* 14, 386–92.
- Hulbert AJ** (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277–288.
- Imai H**, Hayashi T, Negawa T, Nakamura K, Tomida M, Koda K, Tajima T, Koda Y, Suda K, Era S (2002). Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol* 52, 35–40.
- Inal M**, Akyuz F, Turgut A, Getsfrid WM (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 33 (4), 564–7.
- Inayama T**, Kumagai Y, Sakane M, Saito M, Matsuda M (1996). Plasma protein-bound sulfhydryl group oxidation in humans following a full marathon race. *Life Sci* 59(7), 573–578.
- Inayama T**, Oka J, Kashiba M, Saito M, Higuchi M, Umegaki K, Yamamoto Y, Matsuda M (2002). Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life Sci* 70(17), 2039–2046.
- Inoue T**, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, Okochi T (1993). Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 84, 720–725.
- Isfort RJ**, Hinkle RT, Jones MB, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Anderson NL, Sheldon RJ (2000). Proteomic analysis of the atrophying rat soleus muscle following denervation. *Electrophoresis* 21, 2228–2234.
- Isfort RJ**, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Farrar RP, Bodine SC, Anderson NL (2002). Proteomic analysis of rat soleus muscle undergoing hindlimb suspension induced atrophy and reweighting hypertrophy. *Proteomics* 2, 543–550.
- Janaszewska A**, Bartosz G (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62, 231–236.
- Jarrold B**, DeMuth J, Greis K, Burt T, Wang F (2005). An effective skeletal muscle prefractionation method to remove abundant structural proteins for optimized two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 26, 2269–2278.
- Jayaprakasha GK**, Tamil S, Sakariah KK (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res* 36, 117–122.

- Jeanrenaud B** (1965). Lipid components of adipose tissue. In: Ranold AE, Cahill GF, editors. *Handbook of physiology: adipose tissue*. Washington, DC: American Physiological Society, 169-80.
- Jenkins RR** (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 5, 156-170.
- Jenkins RR**, Goldfarb A (1993). Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc* 25(2), 210-2.
- Jenkins RR**, Krause K, Schofield LS (1993). Influence of exercise on clearance of oxidant stressproducts and loosely bound iron. *Med Sci Sports Exerc* 25(2), 213-217.
- Ji LL** (1999). Antioxidants and Oxidative stress in exercise P.S.E.B.M. 222, 283-292.
- Ji LL** (2007). Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 42, 582-593.
- Ji LL**, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 425-435.
- Ji LL**, Stratman FW, Lardy HA (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem Biophys* 263(1), 150-160.
- Kagan VE**, Tyurina YY (1998). Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann N.Y. Acad Sc* 854, 425-434.
- Kanter MM**, Nolte LA, Holloszy JO (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 74(2), 965-969.
- Kayyali US**, Donaldson C, Huang H, Abdelnour R, Hassoun PM (1998). Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J Biol Chem* 43, 2405-2410.
- Keilin D**, Hartree EF (1934). Inhibitors of catalase reaction. *Nature* 134, 933.
- Keles MS**, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 28, 141-143.
- Kelley WN**, Beardmore TD (1970). Allopurinol: alteration in pyrimidine metabolism in man. *Science* 169, 388-390.
- Kim S**, Park SH, Lee HN, Park T (2008). Prunus mume extract ameliorates exercise-induced fatigue in trained rats. *J Med Food* 11(3), 460-8.
- Kim SH**, Park KS, Chang MJ, Sung JH (2005). Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness* 45(2), 178-82.
- Kinnunen S**, Hyypä S, Lappalainen J, Oksala N, Venojärvi M, Nakao C, Hänninen O, Sen CK, Atalay M (2005). Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *Eur J Appl Physiol* 93, 496-501.

- Klebanoff SJ** (1988). Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York Raven, 391–444.
- Klein S**, Coyle EF, Wolfe RR (1994). Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. *Am J Physiol* 267, E934-940.
- Komulainen J**, Takala TE, Vihko V (1995). Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? *Int J Sports Med* 16, 150-154.
- Kooy NW**, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 16, 149–156.
- Koyama K**, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A (1999). Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80(1), 28–33.
- Krenitsky TA**, Tuttle JV, Cattau EL, Wang P (1974). A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp Biochem Physiol* 49B, 687-703.
- Kroon PA**, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am Soc Clin Nutr* 80, 15-21.
- Kyparos A**, Salonikidis K, Nikolaidis MG, Kouretas D (2007). Short duration exhaustive aerobic exercise induces oxidative stress: a novel play-oriented volitional fatigue test. *J Sports Med Phys Fitness* 47, 483-490.
- Laaksonen DE**, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK (1999). Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox Rep* 4(1-2), 53–59.
- Lamprecht M**, Greilberger JF, Schwabberger G, Hofmann P, Oettl K (2008). Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol* 104, 1611-1617.
- Lamprecht M**, Oettl K, Schwabberger G, Hofmann P, Greilberger JF (2009). Protein modification responds to exercise intensity and antioxidant supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 41, 155-63.
- Lang JK**, Gohil K, Packer L, Burk RF (1987). Selenium deficiency, endurance exercise capacity, and antioxidant status in rats. *J Appl Physiol* 63, 2532-2535.
- Lawrence JD**, Bower RC, Riehl WP, Smith JL (1975). Effects of alphatocopherol acetate on the swimming endurance of trained swimmers. *Am J Clin Nutr* 28, 205–208.
- Le Bihan MC**, Tarelli E, Coulton GR (2004). Evaluation of an integrated strategy for proteomic profiling of skeletal muscle. *Proteomics* 4, 2739–2753.

- Lee DK**, Wang DP (1999). Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm* 25, 1205-1208.
- Lee FT**, Kuo TY, Liou SY, Chien CT (2009). Chronic *Rhodiola rosea* extract supplementation enforces exhaustive swimming tolerance. *Am J Chin Med* 37(3), 557-72.
- Leeuwenburgh C**, Heinecke JW (2001). Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise Current Medicinal Chemistry 8, 829-838.
- Leeuwenburgh C**, Ji LL (1995). Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 316, 941-949.
- Lemaitre RN**, Siscovick DS, Berry EM, Kark JD, Friedlander Y (2008). Familial aggregation of red blood cell membrane fatty acid composition: the Kibbutzim Family Study. *Metabolism* 57, 662-668.
- Levine RL**, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 15036-15040.
- Levine RL**, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 15036-15040.
- Li JX**, Tong CW, Xu DQ, Chan KM (1999). Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80(2), 113-117.
- Li Y**, Koike K, Che Q, Yamaguchi M, Takahashi S (1999). Changes in lactate dehydrogenase and 3-hydroxyacetyl-CoA dehydrogenase activities in rat skeletal muscle by the administration of *Eucommia ulmoides* OLIVER leaf with spontaneous running-training. *Biol Pharm Bull* 22(9), 941-6.
- Linnane AW**, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 959, 396-411.
- Liu J**, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN (2000). Chronically and acutely exercised rats: markers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 89, 21-28.
- Liu ML**, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H, Yki-Yarvinen H, Taskinen MR (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 276(6), E1083-91.
- Loughna PT**, Mason P, Bayol S, Brownson C (2000). The LIM-domain protein FHL1 (SLIM 1) exhibits functional regulation in skeletal muscle. *Mol Cell Biol Res Commun* 3, 136-140.
- Lovlin R**, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56(3), 313-6.

- Luiken JJ**, Schaap FG, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF (1999). Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 34 (suppl), 169-175.
- Lyall KA**, Hurst SM, Cooney J, Jensen D, Lo K, Hurst RD, Stevenson LM (2009). Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(1), R70-81.
- Malm C** (2001). Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 171, 233-9.
- Malm C**, Svensson M, Ekblom B, Sjodin B (1997). Effects of ubiquinone-10 supplementation and high intensity training on physical performance in humans. *Acta Physiol Scand* 161, 379-384.
- Manach C**, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am Soc Clin Nutr* 79, 727-47.
- Manach C**, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(suppl), 230S– 42S.
- Margaritis I**, Tessier F, Richard MJ, Marconnet P (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 18(3), 186–190.
- Margonis K**, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K, Kouretas D (2007). Oxidative stress markers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med* 43, 901-910.
- Marshall RJ**, Scott KC, Hill RC, Lewis DD, Sundstrom D, Jones GL, Harper J (2002). Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. *J Nutr* 132, 1616S-1621S.
- Masson P**, Froment MT, Darvesh S, Schopfer LM, Lockridge O (2001). Aryl acylamidase activity of human serum albumin with o-nitrotrifluoroacetanilide as the substrate. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22, 463-9.
- Mastaloudis A**, Leonard SW, Traber MG (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 31, 911-922.
- Masters C**, Pegg M, Cranc D (1986). On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70, 113-120.
- May JM**, Qu Z, Whitesell RR, Cobb CE (1996). Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 20(4), 543-51.



- McArdle A**, van der Meulen JH, Catapano M, Symons MC, Faulkner JA, Jackson MJ (1999). Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats. *Free Radic Biol Med* 26, 1085-91.
- McArdle WD**, Katch FI, Katch VL (1991). Exercise physiology: energy, nutrition, and human performance. Philadelphia: Lea & Febiger, 335.
- McBride JM**, Kraemer W J (1999). Free Radicals, Exercise, and Antioxidants (Vol. 13, pp. 175-183): National Strength and Conditioning Association.
- McCarter RJM** (2000). In Studies in Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Eds., Sen C, Packer L, Hanninen O, Amsterdam, 797-830.
- McCord JM**, Fridovich I (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243, 5753-5760.
- McGrath MJ**, Mitchell CA, Coghill ID, Robinson PA, Brown S (2003). Skeletal muscle LIM protein 1 (SLIM1/FHL1) induces  $\alpha_5\beta_1$ -integrindependent myocyte elongation. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1513– C1526.
- McManus J** (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23, 99-108.
- Michailidis Y**, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG., Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39, 1107-1113.
- Mills PC**, Smith NC, Harris RC, Harris P (1997). Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. *Res Vet Sci* 62, 11-6.
- Misra HP**, Fridovich I (1972). The generation of superoxide radical autoanduring the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 21, 6960-2.
- Morihara N**, Ushijima M, Kashimoto N, Sumioka I, Nishihama T, Hayama M, Takeda H (2006). Aged garlic extract ameliorates physical fatigue. *Biol Pharm Bull* 29(5), 962-6.
- Murray R** (2003). Red and White Blood Cells, McGraw-Hill, New York.
- Mylonas C**, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13, 295-309.
- Nandi D**, Patra RC, Swarup D (2006). Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food Chem Toxicol* 44, 1579-1584.
- Nesher R**, Karl IE, Kipnis DM (1985). Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* 249, 226-232.
- Nijveldt R**. Van Nood Els, Van Hoorn EC, P. Boelens G. Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am Soc Clin Nutr* 74, 48-25.

- Nikolaidis MG**, Jamurtas AZ (2009). Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Arch Biochem Biophys* 490, 77–84.
- Nikolaidis MG**, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med* 38, 579-606.
- Nikolaidis MG**, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 38, 1443-1450.
- Nikolaidis MG**, Kyparos A, Hadziioannou M, Panou N, Samaras L, Jamurtas AZ, Kouretas D (2007). Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 197-205.
- Nikolaidis MG**, Mougios V (2004). Effects of exercise on the fatty acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med* 34, 1051–1076.
- Nishino T**, Okamoto K, Eger BT, Pai EF (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J* 275, 3278–3289.
- Niu AJ**, Wu JM, Yu DH, Wang R (2008). Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats. *Int J Biol Macromol* 42(5), 447-9.
- Norman B**, Sollevi A, Kaijser L, Jansson E (1987). ATP breakdown products in human skeletal muscle during prolonged exercise to exhaustion. *Clin Physiol* 7, 503-510.
- Novelli GP**, Braciotti G, Falsini S (1990). Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med* 8, 9–13.
- O'Connell K**, Gannon J, Doran P, Ohlendieck K (2007). Proteomic profiling reveals a severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle. *Int J Mol Med* 20, 145–153.
- Oetl K**, Reibnegger G, Schmut O (2010). The redox state of human serum albumin in eye diseases with and without complications. *Acta Ophthalmol* (in press).
- Oetl K**, Stauber RE (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 151, 580–590.
- Ogasawara Y**, Namai T, Togawa T, Ishii K (2006). Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 353-8.
- Okamura K**, Doi T, Sakurai M, Hamada K, Yoshioka Y, Sumida S, Sugawa-Katayama J (1997). Effect of endurance exercise on the tissue 8-hydroxy-deoxyguanosine content in dogs. *Free Radic Res* 26(6), 523–528.

- Okumura N**, Hashida-Okumura A, Kita K, Matsubae M, Matsubara T, TakaoT, Nagai K (2005). Proteomic analysis of slow- and fast- twitch skeletal Muscles. *Proteomics* 5, 2896–2906.
- Orhan H**, van Holland B, Krab B, Moeken J, Vermeulen NP, Hollander P, Meerman JH (2004). Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: Increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res* 38(12), 1269–1279.
- Orr WC**, Sohal RS (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-30.
- Oztasan N**, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, Siktar E, Keles S, Akar S, Akcay F, Dane S, Gul M (2004). Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 91(5–6), 622–627.
- Pacher P**, Nivorozhkin A, Szabó C (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 58(1), 87-114.
- Palazzetti S**, Richard MJ, Favir A (2003). Overload training increase exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 28(4), 588-604.
- Palmer FM**, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 89, 100-107.
- Panoutsopoulos GI**, Beedham C (2004). Kinetics and specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase towards substituted benzaldehydes. *Acta Biochim Polon* 51, 649-663.
- Park YD**, Kim SY, Jang HS (2004). Towards a proteomic analysis of atopic dermatitis: a two-dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis/mass spectrometric analysis of cultured patient-derived fibroblasts. *Proteomics* 4, 3446-55.
- Parks DA**, Granger DN (1983). Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 245, G285–G289.
- Patsoukis N**, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou, F, Matsokis NA (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol- induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357, 83–86.
- Paula FB**, Gouvêa CM, Alfredo PP, Salgado I (2005). Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complement Altern Med* 17, 5-17.
- Pea F** (2005). Pharmacology of drugs for hyperuricemia: mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib Nephrol* 147, 35–46.

- Piec I**, Listrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG, Bechet D (2005). Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J* 19, 1143–1145.
- Pignatelli B**, Friesen M, Walker EA (1980). The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation, in: E.A.Walker, I.Griciute, M. Castegnaro, M. Borzsonyi (Eds.), *N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence*, IARC Scientific Publications, Vol. 31, Lyon, pp. 95–110.
- Powers S**, Hamilton K (1999). Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med* 18, 525–536.
- Powers SK**, Jackson MJ (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243–1276.
- Powers SK**, Lennon SL (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-33.
- Prajda N**, Weber G (1975). Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 59, 245–249.
- Quinlan GJ**, Evans TW, Gutteridge JMC (1994). Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* 20, 289–298.
- Radak Z**, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H (1995). Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 79(1), 129–135.
- Radak Z**, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 72(3), 189–194.
- Radak Z**, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27(1-2), 69-74.
- Radak Z**, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Palaez F, Goto S (2002). Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 445(2), 273–278.
- Rajguru SU**, Yeargans GS, Seidler NW (1994). Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulfhydryls. *Life Sci* 54(3), 149–157.
- Rechner AR**, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad Biol Med* 33, 220-235.
- Reddy YN**, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC (2004). Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc* 51, 213–218.

- Reid MB** (2001). Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90, 724-31.
- Reid MB**, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS (1992). Reactive oxygen in muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 73(5), 1797-804.
- Reid MB**, Stokic DS, Koch SM, Khawli FA, Leis AA (1994). *N*-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest* 94, 2468–2474.
- Ren JM**, Hultman E (1989). Regulation of glycogenolysis in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 67, 2243-2248.
- Renaud S**, de Lorgeril M (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526.
- Revilla E** Ryan JM (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *J Chromatogr A* 881, 461-469.
- Reznick AZ**, Witt E, Matsumoto M, Packer L (1992). Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle eof resting and exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 189(2), 801–806.
- Rice-Evans CA**, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Rietjens SJ**, Beelen M, Koopman R, Van Loon LJ, Bast A, Haenen GR (2007). A single session of resistance exercise induces oxidative damage in untrained men. *Med Sci Sports Exerc* 39, 2145-2151.
- Roche M**, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 582, 1783-7.
- Rodland KD** (2004). Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry. *Clin Biochem* 37, 579– 83.
- Roh GS**, Shin Y, Seo SW (2004). Proteome analysis of differential protein expression in allergen-induced asthmatic mice lung after dexamethasone treatment. *Proteomics* 4, 3318-27.
- Rokitzki L**, Logemann E, Sagredos AN, Murphy M, Wetzel-Roth W, Keul J (1994). Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand* 151, 149–158.
- Rott KT**, Agudelo CA (2003). Gout. *J Am Med Assoc* 289, 2857–2860.
- Sahu SC**, Gray GC (1997). Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol* 35, 443–447.

- Sakihama Y**, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002). Plant phenolic antioxidants and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67-80.
- Sasaki K**, Hosoya R, Wang Y-M, Raulston GL (1983) Formation and disposition of 7-hydroxymethotrexate in rabbits. *Biochem Pharmacol* 33, 503.
- Sastre J**, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Vina J (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 263(5 Pt 2), R992–R995.
- Scalbert A**, Williamson G (2000). Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 20735-855.
- Scorza G**, Minetti M (1998). One-electron oxidation pathway of thiols by peroxynitrite in biological fluids: bicarbonate and ascorbate promote the formation of albumin disulfide dimer in human blood plasma. *Biochem J* 329, 405-413.
- Selivanov VA**, Zeak JA, Roca J, Cascante M, Trucco M, Votyakova TV (2008). The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* 283, 29292–29300.
- Semin I**, Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, Uysal N, Delen Y, Gure A (2000). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels of intestinal renal and muscle tissues after a 60 minutes exercise in trained mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 44(4), 419–427.
- Sen CK**, Rankinen T, Vaisanen S, Rauramaa R (1994). Oxidative stress after human exercise: Effect of N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol* 76(6), 2570–2577.
- Sen CK**, Roy S, Han D, Packer L (1997). Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by alpha-lipoic acid: A flow cytometric analysis. *Free Radic Biol Med* 22(7), 1241–1257.
- Senturk UK**, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, Bor-Kucukatay M, Uyuklu M, Yalcin O, Baskurt OK (2005). Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 99, 1434–1441.
- Serbinova E**, Reznick SKAZ, Packer L (1992). Thiocetic acid protects against ischemia reperfusion injury in the isolated langendorffheart. *Free Radic Res Commun* 17, 49-58.
- Sheffield WP**, McCurdy TR, Bhakta V. “Fusion to Albumin as a Means to Slow the Clearance of Small Therapeutic Proteins Using the Pichia pastoris Expression System, A Case Study In Therapeutic Proteins, Methods and Protocols Series: Methods in Molecular Biology, 308, p.152, Smales MC, David CJ 2005.
- Sherman EM** (1987). Carbohydrate, muscle glycogen, and improved performance. *The Physician and Sportsmedicine* 15, 157.

- Shi J**, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y (2003). Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food* 6, 291-299.
- Shin SJ**, Lee SE, Boo JH (2004). Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice. *Proteomics* 4, 3359-68.
- Shindoh C**, Dimarco A, Thomas A, Manubay P, Supinski G (1990). Effect of *N*-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J Appl Physiol* 68, 2107-2113.
- Sies H** (1991). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. New York: Academic Press.
- Simic MG** (1988). Oxygen radicals in biology and medicine. New York, Plenum Press.
- Singh RP**, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C (2004). Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer* 108, 733-740.
- Sjodin B**, Hellsten Westing Y, Apple FS (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10, 236-254.
- Skarpanska-Stejnborn A**, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E (2009). The influence of supplementation with *Rhodiola rosea* L. extract on selected redox parameters in professional rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 19(2), 186-99.
- Skarpanska-Stejnborn A**, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E, Horoszkiewicz-Hassan M (2008). The influence of supplementation with artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on selected redox parameters in rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18(3), 313-27.
- Slater TF** (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222, 1-5.
- Sloane AJ**, Lindner RA, Prasad SS (2005). Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1416-26.
- Snider IP**, Bazzarre TL, Murdoch SD, Golfarb A (1992). Effects of coenzyme athletic performance system as an ergogenic aid on endurance performance to exhaustion. *Int J Sport Nutr* 2, 272-286.
- Soleas GJ**, Diamandidis ER, Goldberg DM (1997). Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. *J Clin Lab Anal* 11, 287-313.
- Soleas GJ**, Diamandis EP, Goldberg DM (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11, 287-313.
- Song F**, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X, Liu L (2007). Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 112, 599-606.
- Spence JT**, Barber MG, Siegel LM (1982) Determination of the stoichiometry of electron uptake and the midpoint reduction potentials of milk xanthine oxidase at 25 degrees (by microcoulometry), *Biochemistry* 21, 1656-1661.

- Stadtman ER**, Levine RL (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899, 191-208.
- Stagos D**, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D (2005). Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15, 1013-1022.
- Stagos D**, Kouris S, Kouretas D (2004). Plant phenolics protect from bleomycin-induced oxidative stress and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102. *Anticancer Res* 24, 743-745.
- Stagos D**, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D (2007). Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced SCEs in human blood lymphocytes. *J Agric Food Chem* 55, 5246-5252.
- Storey KB**, Storey JM (1996). Natural freezing survival in animals. *Annu Rev Ecol Syst* 27, 365-386.
- St-Pierre J**, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277, 44784-44790.
- Struthers AD**, Donnan PT, Lindsay P, McNaughton D, Broomhall J, MacDonald TM (2002). Effect of allopurinol on mortality and hospitalisations in chronic heart failure: a retrospective cohort study. *Heart* 87, 229-234.
- Sumida S**, Tanaka K, Kitao H, Nakadomo F (1989). Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int J Biochem* 21, 835-838.
- Sutton JR**, Toews CJ, Ward GR, Fox IH (1980). Purine Metabolism During Strenuous Muscular Exercise in Man. *Metabolism* 29(3), 254-260.
- Szapacs ME**, Riggins JN, Zimmerman LJ, Liebler DC (2006). Covalent adduction of human serum albumin by 4-hydroxy-2-nonenal: kinetic analysis of competing alkylation reactions. *Biochemistry* 45, 10521-8.
- Tanguy S**, Morel S, Berthonneche C, Toufektsian MC, de Lorgeril M, Ducros V, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F (2004). Preischemic selenium status as a major determinant of myocardial infarct size in vivo in rats. *Antioxid Redox Signal* 6, 792-796.
- Tauler P**, Sureda A, Cases N, Aguilo A, Rodriguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA, Pons A (2006). Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem* 17(10), 665-671.
- Taylor CR**, Weibel ER, Weber J-M, Vock R, Hoppeler H, Roberts TJ, Brichon G (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. *J Exp Biol* 199, 1643.



- Terkeltaub RA** (1993). Gout and mechanisms of crystal-induced inflammation. *Curr Opin Rheumatol* 5, 510–516.
- Tian J**, Washizawa N, Gu LH, Levin MS, Wang L, Rubin DC, Mwangi S, Srinivasan S, Jones DP, Ziegler T (2007). Local glutathione redox status does not regulate ileal mucosal growth after massive small bowel resection in rats. *J Nutr* 137, 320-325.
- Tian L**, Cai Q, Wei H (1998). Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med* 24, 1477-1484.
- Tietze F** (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27, 502–522.
- Tubaro E**, Lotti B, Santiangeli C, Cavallo G (1980). Xanthine oxidase: an enzyme playing a role in killing mechanism of polymorphonuclear leucocytes. *Biochem Pharmac* 29, 3018-320.
- Van der Vusse GJ**, Reneman RS (1996). Lipid metabolism in muscle. In: Rowell LB, Shepherd JT, editors. Handbook of physiology: regulation and integration of multiple systems. New York: Oxford University Press 1075-123.
- Vasankari TJ**, Kujala UM, Vasankari TM, Vuorimaa T, Ahotupa M (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic Biol Med* 22(3), 509-13.
- Venditti P**, Di Meo S (1996). Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys* 331(1), 63–68.
- Verrills MN** (2006). Clinical Proteomics: Present and Future Prospects. *Clin Biochem Rev* 27, 99-116.
- Veskoukis AS**, Kouretas D, Panoutsopoulos GI (2006). Substrate specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase for methyl- and nitrobenzaldehydes. *Eur J Drug Metabol Pharm* 31, 11-16.
- Vider J**, Lehtmaa J, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer K, Kairane C, Landor A, Karu T, Zilmer M (2001). Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology* 7(4), 263-270.
- Vina J**, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50, 271–277.
- Visioli F**, Colombo C, Galli C (1998). Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 487–489.

- Vitorino R**, Ferreira R, Neuparth M, Guedes S, Williams J, Tomer KB, Domingues PM, Appell HJ, Duarte JA, Amado FML (2007). Subcellular proteomics of mice gastrocnemius and soleus muscles. *Anal Biochem* 366, 156–169.
- Vivanco F**, Padial LR, Darde VM, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Natacha Diaz-Prieto, Barderas MG (2008). Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis. *Biomarker Insights* 3, 101–113.
- Voces J**, Alvarez AI, Vila L, Ferrando A, Cabral de Oliveira C, Prieto JG (1999). Effects of administration of the standardized Panax ginseng extract G115 on hepatic antioxidant function after exhaustive exercise. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123(2), 175-84.
- Voces J**, Cabral de Oliveira AC, Prieto JG, Vila L, Perez AC, Duarte ID, Alvarez AI (2004). Ginseng administration protects skeletal muscle from oxidative stress induced by acute exercise in rats. *Braz J Med Biol Res* 37(12), 1863-71.
- Wagatsuma A**, Fujimoto K, Yamada S (2002). Alteration in albumin level during modified muscular activity. *Scand J Med Sci Sports* 12, 143-9.
- Wagatsuma A**, Yamada S (2000). Specific protein alteration in the soleus following immobilization-atrophy. *Scand J Med Sci Sports* 10, 205-10.
- Wagatsuma A**, Yamazaki Y, Mizuno K, Yamada S (2001). Molecular properties and gene expression of albumin in the skeletal muscle following hindlimb immobilization in a shortened position. *Acta Neuropathol* 101, 540-6.
- Wang IK**, Lin-Shiau SY, Lin J.K (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 35, 1517–1525.
- Wayner DD**, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924(3), 408-19.
- Wayner DMM**, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke S (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924, 408–419.
- Wilhelm M**, Tobias R, Asskali F, Kraehner R, Kuly S, Klinghammer L, Boehles H, Daniel WG (2008). Red blood cell omega-3 fatty acids and the risk of ventricular arrhythmias in patients with heart failure. *Am Heart J* 155, 971–977.
- Williamson G**, Manach C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81, S243-55.

- Winterbourn CC**, Vissers MC Kettle AJ (2000). Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 7, 53–58.
- Witt EH**, Reznick AZ, Viguie CA, Starke-Reed P, Packer L (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr* 122, 766-773.
- Woolfolk CA**, Downard JS (1977). Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteria. *J Bacteriol* 130, 1175.
- Wortmann RL** (2005). Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol* 17, 319–324.
- Yamada S**, Tomino S, Izumi S, Akino M (1984). Purification, molecular properties and biosynthesis of a specific protein component induced under compensatory hypertrophy in the rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 98, 260-267.
- Yan JX**, Harry RA, Wait R, Welson SX, Emery PW, Preedy VP, Dunn MJ (2001). Separation and identification of rat skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 1, 424–434.
- Yeo S**, Roh GS, Kim DH (2004). Quantitative profiling of plasma peptides in asthmatic mice using liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 3308-17.
- Yildirim S**, Tok H, Koksall H, Erdem L, Baykan A (2002). Allopurinol plus pentoxifylline in hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Asian J Surg* 25, 149–153.
- You T**, Goldfarb AH, Bloomer RJ, Nguyen L, Sha X, McKenzie MJ (2005). Oxidative stress response in normal and antioxidant supplemented rats to a downhill run: Changes in blood and skeletal muscles. *Can J Appl Physiol* 30(6), 677–689.
- Young IS**, McEneny J (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29(2), 358-62.
- Yu F**, Lu S, Yu F, Feng S, McGuire PM, Li R, Wang R (2006). Protective effects of polysaccharide from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) on the swimming exercise-induced oxidative stress in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 84(10), 1071-9.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### *1. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων.*

<b>Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (separating gel)</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες (mL) για 1 πήκτωμα</i>
1,5M Tris-HCL, pH 8,8	12,5
SDS 10% (w/v)	0,5
ddH <sub>2</sub> O	19,85
Ακρυλαμίδιο/Bis 30%	16,65
Ammonium persulfate 10%	0,5
TEMED	0,03
Τελικός όγκος	50

<b>Πήκτωμα συσσωρεύσεως (stacking gel)</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες (mL) για 1 πήκτωμα</i>
1M Tris-HCL, pH 6,8	1,25
SDS 10% (w/v)	0,1
ddH <sub>2</sub> O	7,25
Ακρυλαμίδιο/Bis 30%	1,3
Ammonium persulfate 10%	0,1
TEMED	0,01
Τελικός όγκος	10

<b>5 × Running buffer (TGS), pH 8,3</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες (gr/L dH<sub>2</sub>O)</i>
Tris base	15
Γλυκίνη	72
SDS	5

<b>Διάλυμα εξισορρόπησης I</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες για 1 strip</i>
Ουρία	2,16g
1M Tris-HCL, pH 6,8	0,3mL
Γλυκερόλη	1,8mL
10% (w/w) SDS	0,6mL
Βρωμοφαινόλη	ίχνη
DTT	22,5mg
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τελικό όγκο 6mL

<b>Διάλυμα εξισορρόπησης II</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες για 1 strip</i>
Ουρία	2,16g
1M Tris-HCL, pH 6,8	0,3mL
Γλυκερόλη	1,8mL
10% (w/w) SDS	0,6mL
Μπλε της βρωμοφαινόλης	ίχνη
Ιωδοακεταμίδιο	135mg
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τελικό όγκο 6mL

<b>Διάλυμα ενυδάτωσης</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες</i>
Ουρία	1,2613g
Θειουρία	0,4567g
Chaps	0,06g
DTT	0,03mg
Αμφολύτες	0,5%
Μπλε της βρωμοφαινόλης	ίχνη

## **2. Πρωτόκολλο για την πρώτη διάσταση για strip μήκους 18cm και pH 3-10.**

- i. LINEAR, 60 min, 250V.
- ii. RAPID, 4h, 250 V.
- iii. LINEAR, 4h, 6000 V (μέγιστη ένταση ρεύματος 50μΑ/strip).
- iv. RAPID, 6000 V, 50000-60000Vh
- v. LINEAR, 5 min, 500V
- vi. RAPID, 20h, 500V (στις συνθήκες αυτές μπορεί να διατηρηθεί το δείγμα έως 20h).

## **3. Πρωτόκολλο για τη χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.**

*Fix step:* το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα μίγματος μεθανόλης 50% + οξικού οξέος 5% και αναδεύεται για 20min.

*Wash step:* το πήκτωμα πλένεται με διάλυμα μεθανόλης 50% και αναδεύεται για 10min.

*Wash step:* το πήκτωμα ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O και αναδεύεται για όλη τη νύχτα ή για 1h

*Sensitize step:* το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,02% για 1min.

*Wash step:* το πήκτωμα ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O δύο φορές για 1min κάθε φορά.

*Stain step:* το πήκτωμα μεταφέρεται σε κρύο διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  0,1% για 20min.

*Wash step:* το πήκτωμα ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O δύο φορές για 1min κάθε φορά.

*Develop step:* το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 0,04% + 0,19M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και αναδεύεται μέχρι το βάψιμο να είναι επαρκές.

*Stop step:* προστίθενται ~ 50mL οξικού οξέος για να σταματήσει η χρώση.

#### 4. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση western.

<b>1 × διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), pH 8,4</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες για 1L</i>
Tris base	3,03g
Γλυκίνη	14,4g
Μεθανόλη	200mL
dH <sub>2</sub> O	μέχρι 1L

<b>1 × TBST</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες για 1L</i>
Tris base	1,57g
NaCl	8,7g
Tween 20	2mL
dH <sub>2</sub> O	μέχρι 1L

<b>Πήκτωμα διαχωρισμού 8% (resolving gel)</b>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες (mL) για 1 πήκτωμα</i>
1,5M Tris-HCL, pH 8,8	2,5
SDS 10% (w/v)	0,1
ddH <sub>2</sub> O	4,6
Ακρυλαμίδιο/Bis 30%	2,7
Ammonium persulfate 10%	0,1
TEMED	0,006

### 5. Πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων βόστρυχων, στέμφυλων και καρπών σταφυλιών.

**Πίνακας 11.** Πολυφαινολική σύσταση (mg πολυφαινολών/g εκχυλίσματος) εκχυλισμάτων βόστρυχων.

Πολυφαινόλες	Εκχυλίσματα βόστρυχων										
	Αθήρι Σαντορίνης	Ασύρτικο Σαντορίνης	Μαυροτράγανο Σαντορίνης	Μανδηλαριά λιαστά Σαντορίνης	Βηλάνια Σητείας	Μαυροτράγανο Σαντορίνης	Βοϊδόματο Σαντορίνης	Ασύρτικο Σαντορίνης	Ασύρτικο Σαντορίνης	Μανδηλαριά Σαντορίνης	Αθήρι Σαντορίνης
	2007	2006	2008	2007	2006	2007	2006*	2007	2008	2006	2006
Γαλλικό οξύ	7,25	22,65	6,46	12,84	14,67	8,33	11,49	1,78	2,27	31,44	8,9
(+)-Κατεχίνη	51,05	75,87	100,96	85,81	46,46	66,28	46,74	68,85	98,29	65,39	36,49
(-)-Επικατεχίνη	4,02	1,27	5,59	0,43	ND	5,21	11,14	ND	ND	4,34	2,69
Προανθοκυανιδίνη B3	14,9	31,59	19,41	31,55	19,45	21,04	20,54	30,02	25,79	26,01	20,01
Προανθοκυανιδίνη B2	2,49	2,52	4,13	ND	6,66	3,36	ND	2,48	8,55	5,15	2,55
Επιγαλλοκατεχίνη	2,37	4,12	8,53	7,78	6,51	2,68	5,61	3,25	4,46	3,14	4,02
trans-καφταρικό οξύ	9,39	4,84	11,89	1,62	0,61	2,33	16,11	2,15	12,25	4,87	0,4
trans-ρεσβερατρόλη	8,59	6,1	12,14	17,56	11,6	4,85	5,47	5,13	11,42	12,62	3,86
ε-βινιφερίνη	12,07	15,54	24,53	31,42	50,1	15,82	12,79	8,54	14,53	20,15	8,73
Q <sup>a</sup> 3-O-γαλακτοσίδιο	13,63	13,47	14,3	6,63	17,12	11,04	12,06	9,09	19,22	8,2	4,55
Q <sup>a</sup> 3-O-γλυκοσίδιο	4,95	4,53	5,87	4,61	6,15	5,84	3,86	5,15	7,16	2,06	3,01
Q <sup>a</sup> 3-O-ραμνοσίδιο	1,34	0,32	0,79	0,46	1,91	0,63	0,9	0,71	1,53	0,34	0,9
Κερκετίνη	0,5	2,16	0,58	0,6	0,93	0,96	0,8	0,19	0,32	1,4	0,49
Καιμπφερόλη	0,07	0,09	0,12	0,2	0,17	0,17	ND	ND	0,04	0,32	0,03
Καφεϊκό οξύ	0,01	ND	0,05	ND	0,05	0,05	0,51	0,01	ND	0,34	0,07
Συριγγικό οξύ	ND	0,13	0,03	0,07	0,05	0,01	0,14	ND	ND	0,46	0,18
p-κουμαρικό οξύ	0,01	0,08	0,12	0,08	0,07	0,07	0,12	0,04	0,01	0,04	0,04
Φερουλικό οξύ	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	0,04	0,06
TPC	464	451	464	537	454	584	494	574	372	584	559

<sup>a</sup> Κερκετίνη. TPC: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος). ND: Τιμές κάτω από το όριο ανίχνευσης (not detected). \* Η σύσταση των εκχυλισμάτων αυτών έχει δημοσιευθεί στο άρθρο των Anastasiadi et al., 2009.

**Πίνακας 12.** Πολυφαινολική σύσταση (mg πολυφαινολών/g εκχυλίσματος) εκχυλισμάτων στέμφυλων και καρπών.

Πολυφαινόλες	Εκχυλίσματα στέμφυλων			Εκχυλίσματα καρπών						
	Ασύρτικο Σαντορίνης 2007	Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006*	Ασύρτικο Ρόδου 2006*	Μπατίκι Τυρνάβου 2006	Μανδηλαριά Σαντορίνης (μεθανολικό) 2003	Μανδηλαριά Ρόδου 2006*	Μανδηλαριά Σαντορίνης (υδατικό) 2003	Ασύρτικο Σαντορίνης (μεθανολικό) 2003	Ασύρτικο Σαντορίνης 2006*	Ασύρτικο Σαντορίνης (υδατικό) 2003
Γαλλικό οξύ	22,21	13,64	10,78	4,58	1,23	2,24	0,48	0,22	1,03	1,57
(+)-Κατεχίνη	47,4	9,32	105,57	10,87	0,9	95,92	4,09	2,25	151,67	0,35
(-)-Επικατεχίνη	12,5	8,72	37,39	ND	1,1	40,49	2,10	1,08	31,35	0,32
Προανθοκυανιδίνη B3	5,22	3,61	9,96	ND	ND	20,35	ND	ND	24,51	ND
Προανθοκυανιδίνη B2	21,32	3,22	24,01	ND	ND	17,4	ND	ND	10,63	ND
Προανθοκυανιδίνη B1	ND	ND	ND	0,96	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Επιγαλλοκατεχίνη	12,21	0,53	2,93	ND	ND	30,57	ND	ND	40,39	ND
trans-καφταρικό οξύ	0,44	6,4	ND	ND	ND	1,05	ND	ND	4,31	ND
trans-ρεσβερατρόλη	0,29	2	0,33	ND	0,22	ND	0,02	0,01	ND	0,04
ε-βινιφερίνη	1,41	7,55	0,83	ND	ND	0,57	ND	ND	0,17	ND
Q <sup>a</sup> 3-O-γαλακτοσίδιο	4,25	4,63	1,56	ND	ND	2,73	B	ND	3,49	ND
Q <sup>a</sup> 3-O- γλυκοσίδιο	4,63	2,62	7,29	ND	ND	1,08	ND	ND	1,12	ND
Q <sup>a</sup> 3-O- ραμνοσίδιο	1,9	1,78	3,34	ND	ND	ND	0,03	0,04	4,73	0,13
Κερκετίνη	3,52	3,26	4,75	0,35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Καιμπφερόλη	0,54	0,06	0,54	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Καφεϊκό οξύ	0,23	0,38	0,05	0,24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Συριγγικό οξύ	0,25	4,16	0,17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p-κουμαρικό οξύ	0,26	0,47	0,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Φερουλικό οξύ	0,09	0,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TPC	167	208	465	648	223	467	210	88	493	63

<sup>a</sup> Κερκετίνη. TPC: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος). ND: Τιμές κάτω από το όριο ανίχνευσης (not detected). \* Η σύσταση των εκχυλισμάτων αυτών έχει δημοσιευθεί στο άρθρο των Anastasiadi et al., 2009.



## ABSTRACT

The number of studies demonstrating that exercise induces oxidative stress has been increased over the last three decades. Nevertheless, the role of xanthine oxidase, the main contributor of free radicals during exercise, in oxidative stress and performance has not been elucidated yet. This enzyme has a dual role since it leads to generation of free radicals and production of uric acid, which is considered the most important antioxidant in plasma. In the present study, xanthine oxidase activity was inhibited via administration of the chemical compound allopurinol before aerobic exhaustive swimming in rats. This inhibition resulted in induction of oxidative stress and a marked decrease in physical performance, which can be probably attributed to inhibition of uric acid production and is not related to carbohydrate and lipid metabolism. A concurrent approach in this study involved xanthine oxidase inhibition by physical inhibitors potentially present in diet. Several antioxidant grape extracts were found to inhibit xanthine oxidase activity *in vitro*. A potent antioxidant grape extract was administrated in rats before the aforementioned exercise protocol to examine if it possesses antioxidant properties *in vivo*. Although the concentration of the injected extract is commonly used in relative studies it induced oxidative stress in blood and tissues. Exercise performance was not affected by the extract, as it did not inhibit xanthine oxidase activity to the extent that allopurinol did. This study clearly demonstrates that the *in vitro* antioxidant activity might not apply in an *in vivo* system. Therefore, the antioxidant activity of a compound seems to be related to its concentration and the system studied. Thus, the administration of antioxidants before exercise might not be probably advisable.

## ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

**Veskoukis AS**, Kyparos A, Nikolaidis MG, Kouretas D (2009). Alterations in tissue albumin concentration following exercise and allopurinol administration. *17<sup>th</sup> International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 22-24.

**Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D (2009). Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *17<sup>th</sup> International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 22-24.

**Veskoukis AS**, Kontou M, Kyparos A, Nikolaidis MG, Samiotaki M, Panayotou G, Kouretas D (2008). Effect of allopurinol and exercise on protein expression in rat gastrocnemius and soleus muscle. *13<sup>th</sup> Annual Congress of the European College of Sports Science (ECSS)*. Estoril (Portugal), July 9-12.

Kouretas D, **Veskoukis AS**, Kokinos D, Kyparos A, Nikolaidis MG (2008). Effect of allopurinol and exercise on oxidative stress markers in gastrocnemius muscle in rats. *13<sup>th</sup> Annual Congress of the European College of Sports Science (ECSS)*. Estoril (Portugal), July 9-12.

**Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Varamenti E, Kouretas D (2008). The effect of allopurinol on protein carbonyls and swimming performance in rats. *5<sup>th</sup> Panhellenic Meeting of Pharmacology*, Athens, May, 23-25.

**Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D (2008). Effect of xanthine oxidase inhibition on performance and liver glycogen content in rats. *16<sup>th</sup> International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 16-18.

**Veskoukis AS**, Nikolaidis MG, Kyparos A, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D (2008). effect of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress blood markers in rats. *16<sup>th</sup>*

*International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 16-18.

Ganouris G, **Veskoukis AS**, Kyparos A, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Kouretas D (2008). Effect of allopurinol and exercise on total antioxidant capacity in liver in rats. *16<sup>th</sup> International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 16-18.

Kokkinos D, **Veskoukis AS**, Kyparos A, Nikolaidis MG, Kouretas D (2008). Effect of allopurinol and exercise on oxidative stress markers in gastrocnemius muscle in rats. *16<sup>th</sup> International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 16-18.

Deda O, **Veskoukis AS**, Petridou A, Tsalis G, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D, Mougios V (2008). effect of allopurinol on carbohydrate metabolism during exhaustive aerobic exercise in rats. *16<sup>th</sup> International Congress on Physical Education and Sport*. Komotini (Greece), May 16-18.